



PCT/FR 2004/001733

REÇU 08 OCT. 2004

OMPI PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 24 AOUT 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 260299

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>29 JUIL. 2003</b> LIEU <b>99</b> <b>0309361</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>29 JUIL. 2003</b>		<b>1</b> <b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <b>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  LAUER Vincent Les Oréades bâtiment B 20 chemin des Saulniers 25000 Besançon	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) 2807031			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date ____/____/____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date ____/____/____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Dispositif d'imagerie			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		LAUER	
Prénoms		Vincent	
Forme juridique		Entreprise Individuelle	
N° SIREN		4 . 1 . 1 . 6 . 5 . 0 . 2 . 2 . 9	
Code APE-NAF		3 . 3 . 4 . B	
Adresse	Rue	20 chemin des Saulniers	
	Code postal et ville	25000 Besançon	
Pays		France	
Nationalité		Français	
N° de téléphone (facultatif)		03 81 80 11 98	
N° de télécopie (facultatif)		03 81 80 98 70	
Adresse électronique (facultatif)		lauer@waika9.com	

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE <b>29 JUIL. 2003</b> LIEU <b>95</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI <b>0309361</b>	DB 540 W / 260899
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		2807031	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société			
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input checked="" type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Vincent LAUER, demandeur		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'Informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Dispositif d'imagerie

- 5 Domaine technique : il s'agit d'un système d'imagerie à balayage applicable par exemple en microscopie et proche du microscope confocal.

Technique antérieure :

- La technique antérieure comporte les microscopes confocaux à balayage laser, les microscopes confocaux à  
10 disque de Nipkow, les microscopes confocaux à double compensation du type décrit dans le brevet PCT/FR01/02890, et les systèmes à projection de franges décrits dans « Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope » par M.A.A. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson, Optics Letters vol.22 no 24, 15 décembre 1997.

15 Description de l'invention.

L'invention a pour objectif d'améliorer la qualité et la luminosité des images confocales, et en particulier des images confocales obtenues à partir d'un éclairage non cohérent, de manière à concilier les avantages des systèmes confocaux et des systèmes à projection de frange.

- Les images confocales obtenues en éclairage non cohérent résultent toujours d'un compromis entre  
20 le degré de confocalité et la luminosité. Elles comprennent en particulier beaucoup de basses fréquences spatiales correspondant à un niveau de flou élevé. Par rapport aux systèmes confocaux classiques, l'invention a pour objectif d'améliorer le déflouage et la luminosité des images confocales. Bien que surtout efficace en éclairage incohérent, l'invention permet également d'améliorer le déflouage des images confocales obtenues en éclairage cohérent.

- 25 Chaque image en projection de franges est obtenue par calcul à partir d'au moins trois images acquises successivement pour des conditions d'éclairage différentes. Les systèmes à projection de franges sont en outre réputés peu fiables en termes de qualité d'image et sont peu souples d'utilisation (généralement pas de possibilité de modifier la grille utilisée). Par rapport aux systèmes à projection de franges, l'invention a pour objectif d'améliorer la fiabilité des images, de permettre une acquisition plus rapide, et d'introduire  
30 une plus grande souplesse d'utilisation.

A ces fins l'invention consiste en un dispositif d'imagerie comprenant des moyens optiques pour former une première image d'une zone observée d'un objet observé, ces moyens comportant :

- a) un moyen pour éclairer une zone d'éclairage sur l'objet observé, ladite zone d'éclairage ne recouvrant que partiellement la zone observée,
- 35 b) un moyen pour sélectionner la lumière provenant d'une zone de détection de l'objet observé, ladite zone de détection ne recouvrant que partiellement la zone observée,
- c) un dispositif de balayage pour déplacer simultanément sur l'objet observé la zone d'éclairage et la zone de détection,
- d) un système optique formant la première image de l'objet observé sur un premier capteur, par intégration  
40 du faisceau lumineux reçu pendant le balayage de l'objet observé et provenant de la zone de détection,

ledit dispositif d'imagerie étant caractérisé par le fait qu'il comprend :

- e) des moyens optiques pour former une seconde image de l'objet observé à partir d'un faisceau lumineux provenant de l'objet, les moyens optiques pour former la seconde image différant des moyens optiques pour former la première image par la forme et/ou la position relative desdites zones d'éclairage et de détection, ou
- 5 par l'absence de balayage et le fait que la totalité de la zone observée soit éclairée simultanément,
- f) des moyens pour combiner lesdites première et seconde images, pour obtenir une image résultante améliorée.

- En effet, la disponibilité de deux images obtenues différemment permet, au moyen d'un traitement
- 10 adéquat, d'obtenir une image résultante de qualité supérieure à chacune des deux images acquises séparément. Les deux images étant obtenues différemment elles diffèrent entre elles par l'atténuation du signal provenant des zones situées dans le plan de focalisation et hors du plan de focalisation. En calculant la différence entre les deux images affectées de coefficients appropriés, il est possible par d'atténuer très
  - 15 fortement le signal provenant des zones situées hors du plan de focalisation, pour faire ressortir essentiellement le signal provenant des zones situées dans le plan de focalisation.

- Les moyens pour obtenir une image résultante améliorée déterminent de préférence la différence entre la première image affectée d'un premier coefficient multiplicateur, et la seconde image affectée d'un second coefficient multiplicateur. Si par exemple la première image est quasi-confocale et la seconde non confocale, cette technique permet d'éliminer une composante non confocale sur l'image quasi-confocale.
- 20 Une version de l'invention est donc caractérisée par le fait que les moyens pour former la seconde image comportent des moyens pour éclairer l'ensemble de la zone observée de l'objet observé, et des moyens pour former l'image à partir de la totalité de la lumière provenant de la zone observée de l'objet. La seconde image est alors non confocale.

- Toutefois la simple soustraction d'une image confocale et d'une image non confocale n'est pas la
- 25 technique la plus optimale pour améliorer le déflouage. En règle générale il est préférable d'utiliser deux images filtrées différemment. Plus précisément, selon une version optimisée de l'invention:

- la zone de détection et la zone d'éclairage permettant la formation de la première image sont confondues,
- la zone d'éclairage permettant la formation de la deuxième image est la même que celle permettant la formation de la première image,
- 30 - la zone de détection permettant la formation de la deuxième image est complémentaire de la zone d'éclairage permettant la formation de la deuxième image.

"complémentaire" signifie ici que la zone de détection est disjointe de la zone d'éclairage et que les zones d'éclairage et de détection, réunies, forment une ouverture suffisamment étendue pour ne plus filtrer le faisceau de manière notable et pour qu'il n'y ait donc pratiquement plus d'"effet confocal"..

- 35 En effet dans ce cas, si la première image est quasi-confocale, on montre que l'image résultante peut être épurée de sa composante confocale, dans des conditions optimales en termes de dynamique. Par exemple, selon une version du système optimisée pour une luminosité maximale de l'image la zone d'éclairage peut être formée d'un ensemble de bandes éclairées, la zone de détection étant confondue avec la zone d'éclairage pour l'obtention de la première image et complémentaire de la zone d'éclairage pour
- 40 l'obtention de la seconde image. En effet, de cette manière, la seconde image peut elle aussi être réalisée dans

des conditions de filtrage appropriées, et la luminosité est optimisée. Cette solution peut être perfectionnée en utilisant plusieurs réseaux de bandes orientées différemment, ce qui permet d'améliorer l'isotropie de l'image générée.

- 5 Dans une version de l'invention optimisée pour une meilleure dynamique de l'image, la zone d'éclairage peut être formée d'un ensemble de disques éclairés, la zone de détection étant confondue avec la zone d'éclairage pour l'obtention de la première image et complémentaire de la zone d'éclairage pour l'obtention de la seconde image.

Suivant une version de l'invention optimisée pour favoriser les fréquences spatiales élevées dans l'image obtenue :

- 10 - la première image est formée au moyen d'une zone d'éclairage constituée par un premier ensemble de disques microscopiques, et d'une zone de détection constituée par un ensemble de disques concentriques aux disques du premier ensemble,  
- la seconde image est formée au moyen d'une zone d'éclairage constituée par un second ensemble de disques microscopiques, et d'une zone de détection constituée par un ensemble d'anneaux concentriques aux  
15 disques du second ensemble.

- D'une manière générale il est nécessaire de prévoir des techniques pour que la première et la seconde image puissent être obtenues différemment, que ce soit successivement ou simultanément. Par exemple, le dispositif peut comporter des moyens pour modifier la forme et/ou la position d'un filtre spatial délimitant la zone de détection et/ou la zone d'éclairage après formation de la première image et avant  
20 formation de la deuxième image, pour que la seconde image diffère de la première par la forme et/ou la position relative des zones d'éclairage et de détection utilisées.

- Par exemple on peut prévoir des moyens pour échanger le premier et/ou le deuxième filtre spatial. Il est également possible que le premier et/ou le deuxième filtre spatial soit composé de deux plaques glissant l'une sur l'autre, pour modifier les première et deuxième zones délimitées par glissement du filtre. On peut  
25 également utiliser pour le premier et/ou le second filtre spatial un dispositif électronique configurable composé par exemple de cristaux liquides ou de micromiroirs.

Enfin, il est également possible de réaliser l'invention avec un filtre spatial fixe. Par exemple, dans un mode de réalisation de l'invention :

- le moyen pour sélectionner la lumière provenant de la zone de détection comporte un filtre spatial délimitant une première zone d'éclairage et de détection, et une ouverture délimitant une deuxième zone d'éclairage et de détection, ou délimitant la zone observée illuminée de manière homogène, l'ouverture étant placée dans le même plan que le filtre spatial,  
30 - le dispositif de balayage et le système optique formant la première image sont adaptés pour permettre successivement la formation de la première image par utilisation de la première zone d'éclairage et de détection, et la formation de la deuxième image par utilisation de l'ouverture.  
35

- Une possibilité pour cela est d'utiliser un miroir galvanométrique placé dans un plan afocal par rapport au filtre spatial, pour faire passer le faisceau par une zone filtrante du filtre spatial ou hors de cette zone. Le miroir peut être celui utilisé pour le balayage dans un système du type décrit dans le brevet PCT/FR01/02890, ce qui permet une réalisation particulièrement simplifiée. Le filtre spatial et l'ouverture  
40 peuvent être réalisés sur une même plaque lithographiée placée dans un plan unique de filtrage spatial, le

miroir galvanométrique permettant de balayer alternativement le filtre spatial et l'ouverture. Si l'ouverture recouvre totalement la zone observée, le balayage n'est pas nécessaire à l'obtention de la deuxième image.

Afin d'éviter les pertes de lumière, il est préférable de ne pas sélectionner la lumière provenant de la zone de détection au moyen d'un filtre absorbant, mais au moyen d'un autre type de filtre permettant une discrimination de la lumière provenant de zones différentes.

Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, le moyen pour sélectionner la lumière provenant de la zone de détection comprend un filtre spatial composé de microprismes permettant de renvoyer dans des directions différentes la lumière provenant de l'objet et atteignant des points différents, pour différencier un premier faisceau provenant d'une première zone de détection utilisée pour former la première image, d'un deuxième faisceau provenant d'une deuxième zone de détection utilisée pour former la deuxième image et disjointe de la première zone de détection.

Pour former ensuite à partir des deux faisceaux deux images distinctes, le moyen pour sélectionner peut comprendre également une lentille intermédiaire pour renvoyer le premier et le deuxième faisceau dans une zone de séparation où ils sont spatialement disjoints. Les deux faisceaux peuvent alors être séparés au moyen d'un dispositif de redirection situé dans la zone de séparation, par exemple un miroir ou un prisme. En termes de coût, il est intéressant de former la première et la deuxième image sur un même capteur. C'est pourquoi suivant un mode de réalisation de l'invention le dispositif de redirection est constitué par au moins un prisme placé dans la zone de séparation, pour modifier la direction d'au moins un des premiers et deuxième faisceaux, et le système comporte également une lentille intermédiaire traversée par les premier et deuxième faisceaux après passage du prisme, pour former simultanément la première et la seconde image de l'objet observé dans deux zones distinctes d'un plan image commun.

Pour permettre un éclairage adéquat dans le cas, de réalisation plus aisée, où le moyen pour éclairer utilise comme filtre spatial le réseau de microprismes, un mode de réalisation avantageux de l'invention est caractérisé par les faits suivants:

- le faisceau lumineux d'éclairage traverse un premier diaphragme d'ouverture puis parvient au filtre spatial composé de microprismes avant de traverser un second diaphragme d'ouverture et de parvenir à l'objet observé,
- le premier diaphragme d'ouverture est positionné de manière à ce que la partie du faisceau d'éclairage qui parvient à une zone du filtre spatial qui transmet ledit deuxième faisceau soit ensuite arrêtée par le second diaphragme d'ouverture, et de manière à ce que la partie du faisceau d'éclairage qui parvient à une zone du filtre spatial qui transmet ledit premier faisceau traverse ensuite le second diaphragme d'ouverture.

En effet, de cette manière, la partie du faisceau d'éclairage qui parvient à la zone de détection utilisée pour la première image est transmise, et la partie du faisceau d'éclairage qui parvient à la zone de détection utilisée pour la deuxième image est arrêtée. Donc, la zone d'éclairage coïncide avec la zone de détection pour la première image et est disjointe de la zone de détection pour la deuxième image.

Il est possible de superposer le faisceau d'éclairage au faisceau revenant de l'objet après qu'il ait traversé un filtre spatial délimitant la zone d'éclairage. Dans ce cas, le faisceau provenant du filtre spatial délimitant la zone d'éclairage traverse une lentille rendant le faisceau afocal avant d'être superposé au faisceau revenant de l'objet. Suivant un aspect de l'invention, il est possible de déplacer suivant l'axe optique

la lentille rendant le faisceau afocal ou le filtre spatial lui-même, afin de compenser l'aberration chromatique entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission.

Description rapide des figures :

- 5 La figure 1 représente le système de balayage utilisé dans un mode de réalisation préféré de l'invention. La figure 2 représente un filtre spatial utilisé dans ce mode de réalisation. Les figures 3 et 4 représentent des superpositions des images géométriques de deux filtres spatiaux du même type correspondant à deux positions de ces filtres. La figure 5 représente la superposition des images géométriques des filtres des figures 6 et 7. Les figures 8 et 9 représentent deux plaques lithographiées dont la superposition permet d'obtenir les
- 10 filtres des figures 6 et 7. La figure 10 représente une variante du système de balayage. La figure 11 représente une plaques lithographiée qui superposée à elle-même permet d'obtenir les filtres spatiaux des figures 11 et 12. La figure 13 montre un filtre spatial comportant une zone filtrante et une zone non filtrante entre lesquelles il est possible d'alterner au moyen d'un miroir galvanométrique. La figure 14 montre un filtre spatial dont la zone filtrante présente des caractéristiques améliorées. La figure 15 montre un système de
- 15 balayage modifié pour permettre une acquisition en temps réel dans des conditions de luminosité optimales. La figure 16 montre le filtre spatial à micropismes utilisé avec le dispositif de la figure 15. La figure 17 illustre le fonctionnement de ce filtre spatial. La figure 18 illustre la formation simultanée de deux images sur le capteur. La figure 19 montre un filtre spatial à micropismes amélioré pour une meilleure isotropie de l'image. La figure 20 montre une vue de côté de ce filtre spatial amélioré. La figure 21 montre une vue de
- 20 côté d'une partie filtrante du filtre spatial de la figure 23. La figure 22 montre, dans une réalisation différente, une vue de côté de la même partie filtrante. La figure 23 montre un filtre spatial à micropismes organisés en disques et anneaux séparés. La figure 24 montre un filtre spatial à micropismes organisés en disques inclus dans des bandes. La figure 25 illustre un mode de réalisation des micropismes. La figure 26 illustre un mode de réalisation très simplifié de l'invention.

25

Premier mode de réalisation:

Ce premier mode de réalisation est représenté sur la figure 1.

- Un faisceau d'éclairage FE provenant d'une lampe à arc munie d'un condenseur traverse un filtre spatial 121. On a représenté sur la figure la partie du faisceau FE qui est issue d'un point du filtre spatial 121.
- 30 Le faisceau d'éclairage FE traverse ensuite une lentille 124 dont un plan focal est sur le filtre spatial 121. Il est ensuite renvoyé par le miroir dichroïque 122 vers le miroir galvanométrique 101 puis vers la lentille 111. Le miroir galvanométrique est dans un plan focal de la lentille 124 et dans un plan focal de la lentille 111. Le faisceau d'éclairage ayant traversé la lentille 111 parvient ensuite à un plan image intermédiaire 112 puis est focalisé par un objectif de microscope 125 sur un objet observé 126. Avantagusement, au lieu d'un objectif
- 35 de microscope 125 à distance finie, on peut utiliser un objectif à distance infinie couplé à une lentille de tube. L'objet observé réémet par fluorescence un faisceau FD à une longueur d'onde différente de la longueur d'onde incidente.

- Le faisceau lumineux FD provenant de l'objet observé 126 et collecté par l'objectif 125 traverse le plan image intermédiaire 112 puis la lentille 111 dont un plan focal est le plan 112. On a représenté sur la
- 40 figure la partie du faisceau FD provenant d'un point particulier de l'objet observé éclairé par la partie du



faisceau FE provenant d'un point du filtre spatial 121, également représentée. Après traversée de la lentille 111 le faisceau FD est en zone afocale, c'est-à-dire que le faisceau provenant d'un point donné du plan 112 devient parallèle après traversée de la lentille 111. Le faisceau parvient ensuite à l'ensemble de balayage et de compensation 120 dont l'entrée et la sortie sont en zone afocale. Le premier élément rencontré par le

5 faisceau dans le dispositif de balayage est la face objet 101(a) du miroir galvanométrique située dans un plan focal de la lentille 111. Cette face du miroir galvanométrique réfléchit le faisceau vers la lentille 102 dont un plan focal est sur la face 101(a) du miroir galvanométrique. Après traversée de la lentille 102 le faisceau parvient au miroir 103 qui réfléchit le faisceau vers un filtre spatial 104 situé dans un plan focal de la lentille 102. Le faisceau ayant traversé le filtre spatial 104 est ensuite réfléchi par le miroir 105 puis traverse la

10 lentille 106 dont un plan focal est sur le réseau 104. Il traverse alors la lentille 107 dont un plan focal est confondu avec un second plan focal de la lentille 106. Il est réfléchi par les miroirs 108 et 109 puis traverse la lentille 110 dont un plan focal est confondu avec le second plan focal de la lentille 107. Il est réfléchi par la face image 101(b) du miroir galvanométrique et sort du dispositif de balayage 120. Il est alors focalisé dans le plan d'un capteur CCD 114 par la lentille 113. Les lentilles 102, 106, 107, 110 sont identiques entre elles. Ce

15 schéma est inspiré du brevet PCT/FR03/00699. Un mode de réalisation équivalent utilise le scanner à 2 lentilles et 4 miroirs décrit dans le brevet PCT/FR03/00699 mais plus difficile à représenter en 2D. Ce schéma correspond à un éclairage en fluorescence, avec éclairage de l'objet par une longueur d'onde d'excitation réfléchie par le dichroïque et détection d'une longueur d'onde d'émission traversant le dichroïque. Des résultats améliorés peuvent être obtenus en ajoutant un filtre monochromateur devant le capteur. Le

20 schéma peut être adapté à un éclairage laser en remplaçant le faisceau d'éclairage FE parvenant au filtre spatial 121 par un faisceau laser, et en remplaçant le filtre 121 par un réseau de microlentilles. Il peut être adapté à un éclairage halogène en réflexion en remplaçant le faisceau d'éclairage FE parvenant au filtre spatial 121 par un faisceau issu d'une lampe halogène et en remplaçant le miroir dichroïque 122 par un miroir semitransparent. En déplaçant la lentille 124 ou le filtre spatial 121 suivant l'axe optique, on peut corriger des

25 aberrations chromatiques induites par l'objectif de microscope entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission.

Par exemple les filtres spatiaux 121 et 104 peuvent être du type représenté sur la figure 2 ou la flèche 200 représente la direction de balayage. Le filtre spatial de la figure 2 est composé de bandes transparentes 201 sur un fond opaque 202. Une première image est réalisée sur le capteur CCD 114 lorsque

30 les zones d'éclairage et de détection sont superposées comme indiqué sur la figure 4 ou les parties claires 212 représentent les zones d'éclairage (image géométrique dans l'objet observé du filtre spatial 121) contrastant par rapport aux zones non éclairées 211, et où les pointillés 213 représentent la limite de la zone de détection (image géométrique dans l'objet observé du filtre spatial 104). Une deuxième image est réalisée sur le capteur CCD 114 lorsque les zones d'éclairage et de détection sont disjointes comme représenté sur la figure

35 3 ou les parties claires 212 représentent la zone d'éclairage (image géométrique du filtre spatial 121) contrastant par rapport aux zones non éclairées 211, et où les pointillés 213 représentent la limite de la zone de détection (image géométrique du deuxième filtre spatial 104). Une image résultante peut être ensuite obtenue par soustraction des première et deuxième images affectées chacune d'un coefficient multiplicateur qui peut être ajusté empiriquement pour obtenir la meilleure qualité d'image possible et qui dans le cas

40 présent vaut approximativement 1. Les images obtenues par la présente technique sont comparables à celles

obtenues avec un système à projection de grille qui utiliserait comme grille le filtre spatial de la figure 2. Le dimensionnement des bandes du filtre spatial de la figure 2 peut se faire par exemple de la même manière que celui du réseau de bandes du filtre spatial de la figure 13, détaillé plus loin. Typiquement, pour ce dimensionnement du système de bandes, si la première image est notée  $I1[i,j]$  et la deuxième est notée  $I2[i,j]$  on peut calculer la résultante  $I1[i,j]-I2[i,j]$ .

Les filtres spatiaux 121 et 104 peuvent également être du type représenté sur les figures 7 et 6. Lors de l'obtention de la première image, ces deux filtres spatiaux sont formés de disques 225 sur fond opaque 224 (figure 6), dont le diamètre peut être proche de celui de la tache d'Airy ou de la demi tache d'Airy selon la précision recherchée, et les zones d'éclairage et de détection, constituées de microdisques, sont exactement superposées. Lors de l'obtention de la deuxième image le filtre spatial 121 est inchangé et le filtre spatial 104 est formé d'anneaux 226 sur fond opaque 227 (figure 7), la zone d'éclairage et la zone de détection se superposant comme indiqué sur la figure 5 ou la zone claire 223 représente la limite de la zone de détection et ou les pointillés 222 limitent la zone d'éclairage. L'épaisseur des anneaux peut être d'une demi tache d'Airy ou beaucoup plus importante. L'image résultante est obtenue comme précédemment. Pour changer de filtre spatial entre la première et la deuxième image on utilise un filtre formé de deux vitres lithographiées placées l'une contre l'autre comme indiqué dans le brevet PCT/FR02/04382. Une des vitres est du type représenté sur la figure 8 et l'autre est du type représenté sur la figure 9. En faisant glisser ces vitres l'une contre l'autre on peut superposer alternativement un trou 228 ou un anneau 229 à un trou 232 et donc alterner entre le filtre représenté figure 6 et celui représenté figure 7.

Lorsque le système est adapté à un éclairage laser, on peut conserver le filtre spatial 104 représenté sur les figures 6 et 7. Le filtre spatial 121 est simplement remplacé par un réseau de microlentilles qui a un effet équivalent.

## 25 Deuxième mode de réalisation

Il est possible également d'utiliser un dispositif de balayage du type représenté figure 10. Ce dispositif de balayage diffère du précédent par le point d'insertion dans le système du faisceau d'éclairage FE et par le fait qu'il utilise un seul filtre spatial. Le faisceau lumineux d'éclairage FE provenant d'une lampe à vapeur de mercure est inséré au moyen d'un dichroïque 100 dans le dispositif, un filtre monochromateur 30 étant installé sur la lampe et un autre filtre monochromateur 130 étant installé devant la caméra. Le filtre spatial 121 est supprimé et le filtre spatial 104 doit donc déterminer à la fois la zone d'éclairage et la zone de transmission. Le système est destiné à l'imagerie en fluorescence mais en supprimant remplaçant les monochromateurs et le dichroïque par un jeu de polariseurs, lame retardatrice et miroir semiréfléchissant, on peut adapter le système à de la microscopie lumière réfléchie.

On peut utiliser un filtre spatial composé de deux vitres lithographiées placées l'une contre l'autre comme indiqué dans le brevet PCT/FR02/04382. Ces deux vitres sont du type représenté sur la figure 11, c'est à dire des bandes transparentes 251 sur un fond opaque 250, la largeur des bandes étant double de l'espacement entre les bandes. La deuxième image est acquise lorsque les vitres sont exactement superposées et que le filtre spatial (et donc les zones d'éclairage et de détection qui sont ici confondues) a donc l'allure de la figure 11. La première image est acquise lorsque les deux vitres sont décalées l'une par rapport à l'autre et

que le filtre a l'allure représentée figure 12, c'est à dire que la largeur des bandes est réduite de moitié. L'image résultante est calculée comme précédemment en soustrayant les deux images affectées de coefficients multiplicateurs.

Une autre solution est d'utiliser le filtre spatial de la figure 2 pour obtenir la première image et de le retirer pour obtenir la deuxième image qui est alors non confocale. Les deux images peuvent être combinées comme précédemment par soustraction des deux images affectées de coefficients multiplicateurs.

Une troisième solution est d'obtenir séparément une première image « confocale » en utilisant le système de balayage et le filtre spatial, et une image non confocale au moyen d'une caméra recevant un faisceau n'ayant pas traversé le système de balayage. Les deux images peuvent être combinées comme précédemment. Par exemple un capteur CCD indépendant peut être atteint par la lumière provenant de l'échantillon sans traverser le dispositif de balayage. Dans ce cas, les deux images peuvent être acquises simultanément.

Une quatrième solution consiste à utiliser un seul filtre spatial 104 comprenant deux zones utiles distinctes et à faire passer la partie utile du faisceau dans l'une ou l'autre des zones utiles au moyen du miroir galvanométrique. Le filtre spatial 104 peut être du type schématisé sur la figure 13. Il comporte, sur un fond noir 260:

- une zone transparente 261 de taille suffisante pour que la totalité de l'image 266 parvenant au capteur 114 puisse être contenue dans cette zone.
- un réseau de bandes 262 de taille supérieure à la taille de l'image parvenant au capteur CCD 114, de manière à ce que l'on puisse effectuer un balayage de l'objet par ce réseau de bandes sans que l'image de la zone observée sur le filtre spatial sorte du réseau de bandes.

Lors de la phase d'imagerie, une première image est acquise avec balayage de l'objet par le réseau de bandes et une deuxième image est acquise sans balayage. Une image résultante est ensuite calculée et affichée.

Lors de l'acquisition de la première image, le balayage est effectué en déplaçant l'image du capteur CCD 114 sur le filtre spatial 104 entre deux positions extrêmes représentées par les pointillés 264 et 265, pendant le temps d'intégration du capteur. Ce déplacement est effectué continûment, au moyen du miroir galvanométrique 101, pendant le temps d'intégration du capteur.

Entre la première et la seconde image, l'image du capteur CCD 114 sur le filtre spatial 104 est déplacée, au moyen du miroir galvanométrique 101, vers la position représentée par les pointillés 266.

La seconde image est alors acquise sans balayage, l'intégralité du faisceau parvenant au capteur 114 traversant la zone transparente 261.

La première et la seconde image peuvent ensuite être recombinaées. Si on note  $I1[i,j]$  la première image et  $I2[i,j]$  la seconde image, alors l'image combinée est par exemple  $I3[i,j] = I1[i,j] - C \cdot I2[i,j]$  ou le facteur constant  $C$  peut être déterminé empiriquement en ajustant pour avoir la plus belle image. Une fois que le coefficient  $C$  est déterminé, il est en principe applicable à toute image obtenue avec les mêmes longueurs d'ondes et le même filtre spatial.

Un dimensionnement possible est le suivant :

- taille du capteur 5x5 mm
- grandissement du système optique  $g=100$  entre l'objet observé et le filtre spatial 104

- longueurs d'ondes utilisées centrées sur  $\lambda=600$  nm
  - ouverture numérique de l'objectif  $ouv=1,4$ .
  - distance  $H1=6$  mm,  $H2=9$  mm,  $L=6$  mm.
  - Pas du réseau de bandes  $p=\frac{\lambda g}{ouv}$  soit  $p=43$  microns
- 5 - épaisseur d'une bande :  $e=\frac{\lambda g}{2ouv}$  soit  $e=21$  microns

La zone recouverte par des bandes est équivalente à une grille du type utilisé dans un système à projection de franges. On peut montrer que pour une même grille (pas et épaisseur des bandes) l'image obtenue à l'aide du présent système est équivalente à celle obtenue avec un système à projection de franges. Des bandes plus épaisses et un pas plus élevé se traduisent par une résolution diminuée et une moindre

10 sensibilité aux aberrations chromatiques.

Une variante de ce filtre spatial est représentée sur la figure 14. Elle diffère du filtre spatial précédent par le fait que la zone recouverte par des bandes comporte trois sous-zones 281, 282, 283 différant entre elles par la direction des bandes.

Lors de l'acquisition de la première image, le balayage est effectué en déplaçant l'image de la zone observée de l'objet sur le filtre spatial de la figure 14 entre deux positions extrêmes représentées par les pointillés 280 et 284, pendant le temps d'intégration du capteur. Ce déplacement est effectué continûment, au moyen du miroir galvanométrique 101, pendant le temps d'intégration du capteur

Lors de l'acquisition de la seconde image, le balayage est effectué en déplaçant l'image de la zone observée de l'objet sur le filtre spatial de la figure 14 entre deux positions extrêmes représentées par les pointillés 284 et 286, pendant le temps d'intégration du capteur. Ce déplacement est effectué continûment, au moyen du miroir galvanométrique 101, pendant le temps d'intégration du capteur

Les deux images peuvent ensuite être combinées sur le même principe que précédemment. Ce filtre spatial amélioré permet l'obtention d'images plus isotropes.

25 Troisième mode de réalisation.

Les modes de réalisation précédents présentent le défaut de ne pas utiliser de manière optimale l'intensité lumineuse disponible. La figure 15 montre une modification de la figure 10 destinée à améliorer en ce sens l'efficacité du système et constitue le mode de réalisation préféré de l'invention. Elle diffère de la figure 10 par l'utilisation d'un filtre spatial modifié 304 et par la présence d'un diaphragme 300 et d'un prisme 301. Une construction appropriée de la ligne d'éclairage est également nécessaire. Le faisceau d'éclairage FE est diaphragmé par un diaphragme d'ouverture 330, traverse la lentille 331, est diaphragmé par un diaphragme de champ 332, et traverse la lentille 333 avant de parvenir au dichroïque 100. Après réflexion par le dichroïque 100 il parvient à la moitié droite du prisme 301. Le diaphragme d'ouverture 330, situé dans un plan conjugué à la zone dans laquelle se trouvent le prisme 301 et le miroir galvanométrique, a pour fonction de limiter l'extension du faisceau d'éclairage sur le prisme 301. Le diaphragme de champ 332 limite l'ouverture du faisceau parvenant au prisme 301. Après traversée du prisme 301, le faisceau FE est réfléchi par la face (b) du miroir galvanométrique 101. Après avoir traversé les lentilles 110, 107, 106 il parvient au filtre spatial 304. Le filtre spatial 304 est représenté sur la figure 16. Il est composé d'une vitre en

verre sur laquelle sont réalisés des microprismes, par exemple 310 et 311. Comme sur les autres dessins la direction de balayage est indiquée par la flèche double épaisse. La figure 17 illustre le fonctionnement de ces microprismes. Le faisceau d'éclairage FE parvenant sur un couple de prismes est divisé en un faisceau FE1 et un faisceau FE2. Le faisceau FE2, après traversée de la lentille 102 puis réflexion par le miroir 103 et la face (a) du miroir galvanométrique 101, est arrêté par le diaphragme d'ouverture 300. Le faisceau FE1, après réflexion par le miroir 103 et la face (a) du miroir galvanométrique 101, traverse la lentille 111 et est dirigé vers le plan intermédiaire 112 puis vers l'objet à observer 126. Par conséquent, l'objet à observer est éclairé par une zone d'éclairage en forme de grille, les microprismes orientés comme 311 générant des bandes claires (zone d'éclairage), et les microprismes orientés comme 310 générant des bandes foncées du fait que le faisceau FE2 provenant de ces microprismes est arrêté par le diaphragme d'ouverture 300. La zone d'éclairage balaye l'objet observé lorsque le miroir galvanométrique se déplace.

Le faisceau FD revenant de l'objet observé parvient à nouveau au filtre spatial 304. Comme indiqué sur la figure 17, le faisceau FD provenant de l'objet observé est divisé par les microprismes en deux faisceaux FD1 et FD2 différant entre eux par leur orientation. Ces deux faisceaux reviennent ensuite à la face (b) du miroir galvanométrique 101 après avoir passé les lentilles 106, 107, 110. A proximité de la face (b) du miroir galvanométrique 101 les deux faisceaux sont séparés spatialement. Chacun des deux faisceaux traverse un demi-prisme différent (les deux moitiés du prisme 301) qui en modifie l'orientation. Après traversée de la lentille 113 les deux faisceaux parviennent en des points différents du capteur 114. Il se forme dans le plan du capteur CCD 114 deux images I1 et I2 dont l'extension est représentée sur la figure 18. La taille de ces images est déterminée par le diaphragme de champ 332 qui doit donc de préférence être rectangulaire. La première image (I1) est obtenue à partir de la lumière ayant retraversé les microprismes orientés comme 311, déjà traversés par le faisceau d'éclairage. Elle est donc obtenue à partir d'une zone de détection coïncidant avec la zone d'éclairage. La deuxième image (I2) est obtenue à partir de la lumière ayant retraversé les microprismes orientés comme 310, qui associés au diaphragme 300 avaient arrêté le faisceau d'éclairage. Elle est donc obtenue à partir d'une zone de détection complémentaire de la zone d'éclairage. Chaque point de l'objet observé a deux points image, par exemple P1 et P2, dont l'un se trouve sur la première image I1 et l'autre se trouve sur la seconde image I2. Le vecteur P1P2 ne dépend pas du point de l'objet observé. Une image résultante est formée en calculant pour chaque point de l'objet observé la différence entre les valeurs acquises sur le capteur pour ses deux points image P1 et P2 après que le miroir galvanométrique ait réalisé un balayage de l'image du filtre spatial sur l'objet observé. Avant calcul de la différence il est possible de multiplier chaque image par un coefficient multiplicatif ayant pour fonction d'ajuster au mieux le résultat pour obtenir la meilleure image possible.

Le dimensionnement de la grille peut être effectué comme précédemment à savoir que la largeur  $e$  d'un microprisme, indiquée figure 16, et correspondant à la largeur d'une bande, peut être par exemple de 21 microns. La largeur d'un microprisme peut aussi être augmentée de manière à rendre le système moins résolvant mais plus robuste aux aberrations, en particulier chromatiques.

Une variante du filtre spatial est représentée par la figure 19. Sa fonctionnalité est similaire à celle du filtre spatial de la figure 14, c'est-à-dire qu'elle permet de rendre la résolution plus isotrope. Les bandes représentées correspondent aux bandes filtrant la première et la seconde image. Le réseau de bandes 401 est identique à celui de la figure 16. Le réseau de bandes 402 est tourné de 60 degrés. Toutefois, il doit renvoyer

la lumière correspondant à la première image et à la seconde image dans la même direction que le réseau de bandes 401. C'est pourquoi la pente des prismes constituant les différentes bandes du réseau 402 n'est pas maximale dans le sens orthogonal à la direction des bandes du réseau 402, mais dans le sens orthogonal à la direction des bandes du réseau 401. Les pointillés traversant le réseau de bandes 401 indiquent des lignes de fracture sur lesquelles la hauteur de chaque prisme est ramenée à zéro, destinés à éviter que les prismes ne deviennent trop épais. La figure 20 montre une vue suivant la direction de ces lignes de fracture. Suivant cette direction on observe les prismes 410 correspondant à un réseau de bandes, et les prismes 411 correspondant au réseau de bandes alternées. Lors de l'acquisition des images la zone éclairée sur le filtre spatial traverse les trois réseaux 401, 402 et 403.

- 5 Le système peut également être réalisé avec filtre spatial de fonctionnalité similaire à celle des filtres spatiaux des figures 5 à 9. La figure 23 montre un tel filtre spatial. Chaque point de ce filtre spatial comprend un microprisme de section circulaire 412 et un microprisme de section annulaire 413. Ces microprismes sont représentés en vue de côté sur les figures 21 (412a et 413a) et sur la figure 22 (412b et 413b) correspondant à des réalisations techniques légèrement différentes. Bien entendu la totalité des microprismes circulaires ont leur pente orientée dans la même direction, qui compte tenu de la configuration employée correspond à la direction de balayage, et la totalité des microprismes annulaires ont leur pente orientée dans la même direction mais en sens inverse.

- Toutefois, en particulier lorsque la zone d'éclairage est constituée par un ensemble de disques rapprochés, il est préférable que la zone de détection pour l'obtention de la deuxième image soit la complémentaire de la zone de détection pour l'obtention de la première image. La figure 24 illustre le filtre spatial correspondant. Il comprend, sur un cadre absorbant 461, des microprismes circulaires, par exemple 460, ayant tous une pente dans la même direction et le même sens, et des microprismes en forme de bandes 462 ou 463 interrompus par les microprismes circulaires et ayant tous une pente dans le sens opposé à celle des microdisques circulaires. Notons que si les microprismes en formes de bandes ont une pente orientée perpendiculairement à la direction des bandes, et donc dans le cas représenté sur la figure, en biais par rapport à la direction de balayage, alors il est préférable de faire légèrement tourner le prisme 301 et le capteur 114 autour de l'axe optique, pour que le prisme 301 sépare deux zones qui ne sont plus symétriques par rapport à un plan orthogonal à la figure, mais par rapport à un plan qui est également en biais.

- Les microprismes peuvent être réalisés par des techniques d'usinage au diamant suivi de moulage. Les microprismes peuvent également être réalisés par lithographie dans la mesure où leur pente est faible et où leur largeur est raisonnable. Ils sont alors approximés par une succession de couches de diélectrique comme indiqué sur la figure 25. Un microprisme est réalisé sur un substrat 420 par dépôt de plusieurs couches 421 à 425 par lithographie. On peut aussi réaliser un moule par lithographie à l'aide de couches métalliques puis mouler le réseau de microprismes dans un polymère.

- Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux car il permet d'obtenir en temps réel des images dans des conditions optimales d'utilisation de l'information.

- Bien qu'il ait été illustré dans une configuration où le filtre spatial à microprismes est traversé à la fois par le faisceau d'éclairage et par le faisceau provenant de l'objet observé, ce mode de réalisation peut également être adapté à une configuration proche du premier mode de réalisation, dans laquelle le faisceau d'éclairage ne traverse pas le filtre spatial à microprismes, étant déjà filtré par un filtre spatial classique

disposé sur la ligne d'éclairage. Dans ce cas, le faisceau d'éclairage FE est unique (il n'est donc pas nécessaire de prévoir un diaphragme 300) et est traité comme sur la figure 1. Le faisceau revenant de l'objet parvient au filtre spatial à microprismes et est donc traité comme sur la figure 15. L'avantage d'une configuration proche du premier mode de réalisation est que la différence d'aberration chromatique entre une longueur d'onde d'excitation de la fluorescence et une longueur d'onde de détection de la fluorescence peut être compensée par un déplacement suivant l'axe optique du filtre spatial disposé sur la ligne d'éclairage ou de la lentille 124 représentée figure 1.

#### Quatrième mode de réalisation.

10 Ce quatrième mode de réalisation vise à illustrer une réalisation peu optimale mais particulièrement simple de l'invention. Il est illustré par la figure 26.

Un faisceau FE issu d'une lampe à vapeur de mercure et dans lequel on a sélectionné une longueur d'onde d'excitation de la fluorescence traverse un dichroïque 448 puis un disque de Nipkow en rotation 441. Le faisceau issu d'un trou microscopique du disque de Nipkow traverse ensuite le séparateur de faisceau 442 et l'objectif 443 qui le focalise sur l'échantillon 445. Le faisceau FD réémis par fluorescence par l'échantillon retransverse l'objectif 443 et parvient au séparateur 442 qui en réfléchit une partie en direction du monochromateur 446 sélectionnant la longueur d'onde d'émission et du capteur 447 sur lequel le faisceau est focalisé et sur lequel se forme une image de l'échantillon observé 445. Le faisceau traversant le séparateur 442 traverse ensuite à nouveau le disque de Nipkow 441 et est réfléchi par le dichroïque 448 pour traverser la lentille 449 qui le focalise sur le capteur 451 après traversée du monochromateur 450 sélectionnant la longueur d'onde d'émission. On obtient sur le capteur 451 une image quasi-confocale constituant la première image et sur le capteur 447 une image non confocale constituant la deuxième image. Les deux images doivent être superposées soit par ajustement de position des caméras soit par superposition au moyen d'un algorithme. Elles peuvent être combinées comme précédemment par soustraction des deux images affectées de coefficients appropriés.

#### Variantes du dispositif de balayage.

Le système peut également être utilisé avec d'autres dispositifs de balayage. Comme dans le quatrième mode de réalisation il est possible de réaliser les différents filtres spatiaux sur un disque de Nipkow. Toutefois les caractéristiques de balayage (trajectoire circulaire, instabilités) tendent à dégrader l'image. Le système peut également être utilisé avec des dispositifs de balayage du type décrit dans le brevet PCT/FR01/02890, par exemple sur la figure 22 de ce brevet, et qui impliquent que le filtre spatial fonctionne en réflexion. Dans ce cas les bandes, disque ou anneaux des filtres spatiaux sont réalisés par dépôt d'une couche réfléchissante sur un fond transparent pour les deux premiers modes de réalisation, ou par réalisation de prismes recouverts d'une couche réfléchissante, pour le troisième mode de réalisation. Dans le cas d'une réalisation des prismes par lithographie, cette solution simplifie la réalisation car les dépôts peuvent tous être métalliques (les prismes réfléchissent la lumière au lieu de la transmettre). D'une manière générale les microprismes peuvent donc être aussi bien des prismes fonctionnant en réflexion que des prismes fonctionnant en transmission.

### Techniques pour déterminer le coefficient multiplicateur

D'une manière générale la combinaison de la première image et de la deuxième image se fait par soustraction de ces deux images affectées d'un coefficient multiplicatif. En fait il n'y a qu'un seul coefficient à déterminer si on fait abstraction du niveau général de luminosité de l'image. La superposition de deux

- 5 images  $I1[i,j]$  et  $I2[i,j]$ , où  $i$  et  $j$  sont les coordonnées entières d'un point du capteur dans le plan, se calcule alors comme  $IR[i,j] = C1*(I1[i,j] - C2*I2[i,j] - C3)$

Avec  $C3 = \text{Min}(I1[i,j] - C2*I2[i,j])$

Et  $C1 = 256/\text{Max}(I1[i,j] - C2*I2[i,j] - C3)$

Dans le cas par exemple d'un affichage sur 256 niveaux de gris, le symbole \* représentant la multiplication.

- 10 On peut écrire un programme affichant l'image résultante  $IR[i,j]$  en fonction du coefficient multiplicateur  $C2$  et comportant une barre d'ajustement permettant de faire varier progressivement ce coefficient entre deux valeurs extrêmes. En faisant varier  $C2$  et en observant l'image résultante, on arrive assez bien à déterminer la valeur de  $C2$  qui génère l'image résultante la plus nette et la plus contrastée, dans laquelle les éléments hors plan de focalisation sont le mieux éliminés. Une fois que ce coefficient  $C2$  est déterminé pour un système
- 15 d'imagerie donné, il reste normalement indépendant de l'échantillon observé.

On peut également déterminer le coefficient  $C2$  par un calcul numérique visant à minimiser l'entropie de la résultante  $IR[i,j]$ . Par exemple on calcule l'entropie de  $IR[i,j]$  pour un ensemble de valeurs de  $C2$  et on choisit la valeur correspondant au minimum d'entropie. L'entropie se calcule comme la somme sur l'ensemble des indices  $i,j$  de  $-IR[i,j]*\log(IR[i,j]/256)$ .

20

### Choix des zones d'éclairage et de détection :

On peut acquérir une première image, dite « pseudo-confocale »  $I1[i,j]$ , pour laquelle la zone d'éclairage et la zone de détection sont confondues. On peut acquérir une deuxième image dite « complémentaire »  $I2[i,j]$ , pour laquelle la zone de détection est la complémentaire de la zone d'éclairage elle-même inchangée.

- 25 L'image « non confocale » vaut alors  $IN[i,j] = I1[i,j] + I2[i,j]$ . L'image  $I1[i,j]$  peut s'écrire

$I1[i,j] = K1*IN[i,j] + K2*IC[i,j]$  où  $IC[i,j]$  est une image confocale « pure » c'est-à-dire dont la luminosité n'augmente pas quand l'épaisseur de la zone fluorescente augmente.  $K1$  et  $K2$  sont des constantes dépendant de la configuration exacte des zones d'éclairage et de détection pour l'acquisition des deux images. On peut donc écrire  $IC[i,j] = 1/K2*I1[i,j] - K1/K2*IN[i,j]$  ou  $IC[i,j] = (1 - K1)/K2*I1[i,j] - K1/K2*I2[i,j]$ . La

- 30 seconde formule donne l'image confocale en fonction de l'image complémentaire et de l'image pseudo-confocale. Si on acquiert l'image pseudo-confocale et l'image non confocale pour calculer l'image confocale, on perd en rapport signal sur bruit. Si on utilise des zones non complémentaires on soustrait une image partiellement confocale ce qui peut permettre une élimination plus complète des basses fréquences, mais ce n'est pas en général l'effet recherché et il est donc préférable d'utiliser des zones complémentaires.

35

### Applications industrielles :

Le présent dispositif d'imagerie peut être utilisé en microscopie pour l'imagerie d'échantillons biologiques ou de matériaux.

40



Revendications (1/2)

- 1-Dispositif d'imagerie comprenant des moyens optiques pour former une première image d'une zone observée d'un objet observé, ces moyens comportant :
- a) un moyen pour éclairer une zone d'éclairage sur l'objet observé, ladite zone d'éclairage ne recouvrant que partiellement la zone observée,
  - b) un moyen pour sélectionner la lumière provenant d'une zone de détection de l'objet observé, ladite zone de détection ne recouvrant que partiellement la zone observée,
  - c) un dispositif de balayage pour déplacer simultanément sur l'objet observé la zone d'éclairage et la zone de détection,
  - d) un système optique formant la première image de l'objet observé sur un premier capteur, par intégration du faisceau lumineux reçu pendant le balayage de l'objet observé et provenant de la zone de détection, ledit dispositif d'imagerie étant caractérisé par le fait qu'il comprend :
  - e) des moyens optiques pour former une seconde image de l'objet observé à partir d'un faisceau lumineux provenant de l'objet, les moyens optiques pour former la seconde image différant des moyens optiques pour former la première image par la forme et/ou la position relative desdites zones d'éclairage et de détection, ou par l'absence de balayage et le fait que la totalité de la zone observée soit éclairée simultanément,
  - f) des moyens pour combiner lesdites première et seconde images, pour obtenir une image résultante améliorée.

- 2- Dispositif selon la revendication 1, caractérisé par le fait que lesdits moyens pour combiner lesdites première et seconde images déterminent la différence entre la première image affectée d'un premier coefficient multiplicateur, et la seconde image affectée d'un second coefficient multiplicateur.

- 3- Dispositif selon une des revendications 1 ou 2, caractérisé par les faits suivants:
- la zone de détection et la zone d'éclairage permettant la formation de la première image sont confondues,
  - la zone d'éclairage permettant la formation de la deuxième image est la même que celle permettant la formation de la première image,
  - la zone de détection permettant la formation de la deuxième image est complémentaire de la zone d'éclairage permettant la formation de la deuxième image.

- 4- Dispositif selon la revendication 3, caractérisé par le fait que la zone d'éclairage est constituée par un réseau de bandes éclairées.

- 5- Dispositif selon la revendication 3, caractérisé par le fait que la zone d'éclairage est constituée par un réseau de disques éclairés.

Revendications (2/2)

6- Dispositif selon une des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait que les moyens pour former la seconde image comportent des moyens pour éclairer l'ensemble de la zone observée de l'objet observé, et  
5 des moyens pour former l' image à partir de la totalité de la lumière provenant de la zone observée de l'objet.

7- Dispositif selon une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait que le dispositif comporte des moyens pour modifier la forme et/ou la position d'un filtre spatial délimitant la zone de détection et/ou la zone d'éclairage après formation de la première image et avant formation de la deuxième image, pour que la  
10 seconde image diffère de la première par la forme et/ou la position relative des zones d'éclairage et de détection utilisées.

8- Dispositif selon une des revendications 1 à 5, caractérisé par les faits suivants :  
- le moyen pour sélectionner la lumière provenant de la zone de détection comporte un filtre spatial  
15 délimitant une première zone d'éclairage et de détection, et une ouverture délimitant une deuxième zone d'éclairage et de détection, ou délimitant la zone observée illuminée de manière homogène, l'ouverture étant placée dans le même plan que le filtre spatial,  
- le dispositif de balayage et le système optique formant la première image sont adaptés pour permettre successivement la formation de la première image par utilisation de la première zone d'éclairage et de  
20 détection, et la formation de la deuxième image par utilisation de l'ouverture.

9- Dispositif une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait que le moyen pour sélectionner la lumière provenant de la zone de détection comprend un filtre spatial composé de microprismes permettant de renvoyer dans des directions différentes la lumière provenant de l'objet et atteignant des points différents,  
25 pour différencier un premier faisceau provenant d'une première zone de détection utilisée pour former la première image, d'un deuxième faisceau provenant d'une deuxième zone de détection utilisée pour former la deuxième image et disjointe de la première zone de détection,

10- Dispositif selon la revendication 9, caractérisé par le fait que le moyen pour sélectionner comprend  
30 - une lentille intermédiaire pour renvoyer le premier et le deuxième faisceau dans une zone de séparation ou ils sont spatialement disjoints,  
- au moins un prisme placé dans la zone de séparation, pour modifier la direction d'au moins un des premiers et deuxième faisceaux,  
- une lentille intermédiaire traversée par les premier et deuxième faisceaux après passage du prisme, pour  
35 former simultanément la première et la seconde image de l'objet observé dans deux zones distinctes d' un plan image commun.

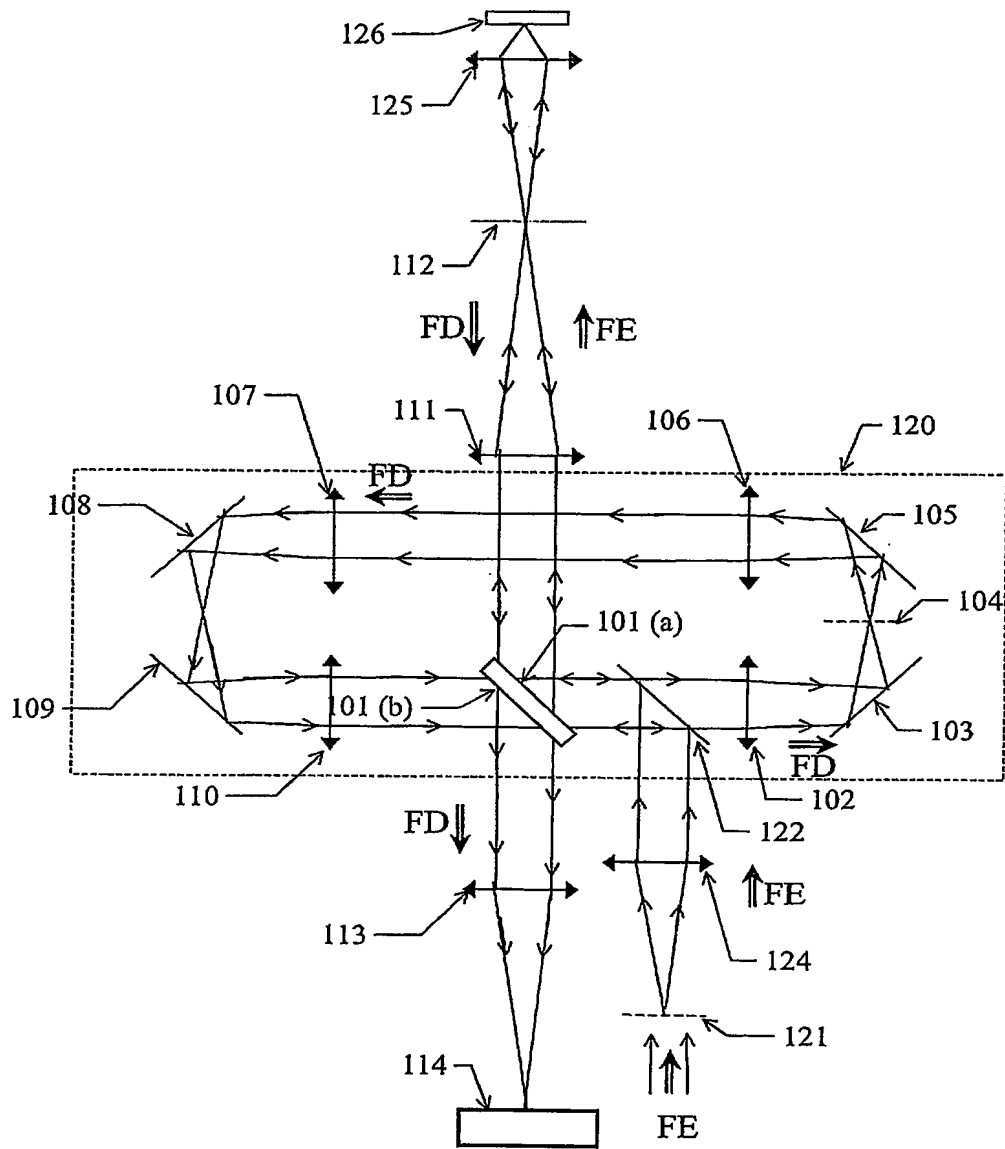
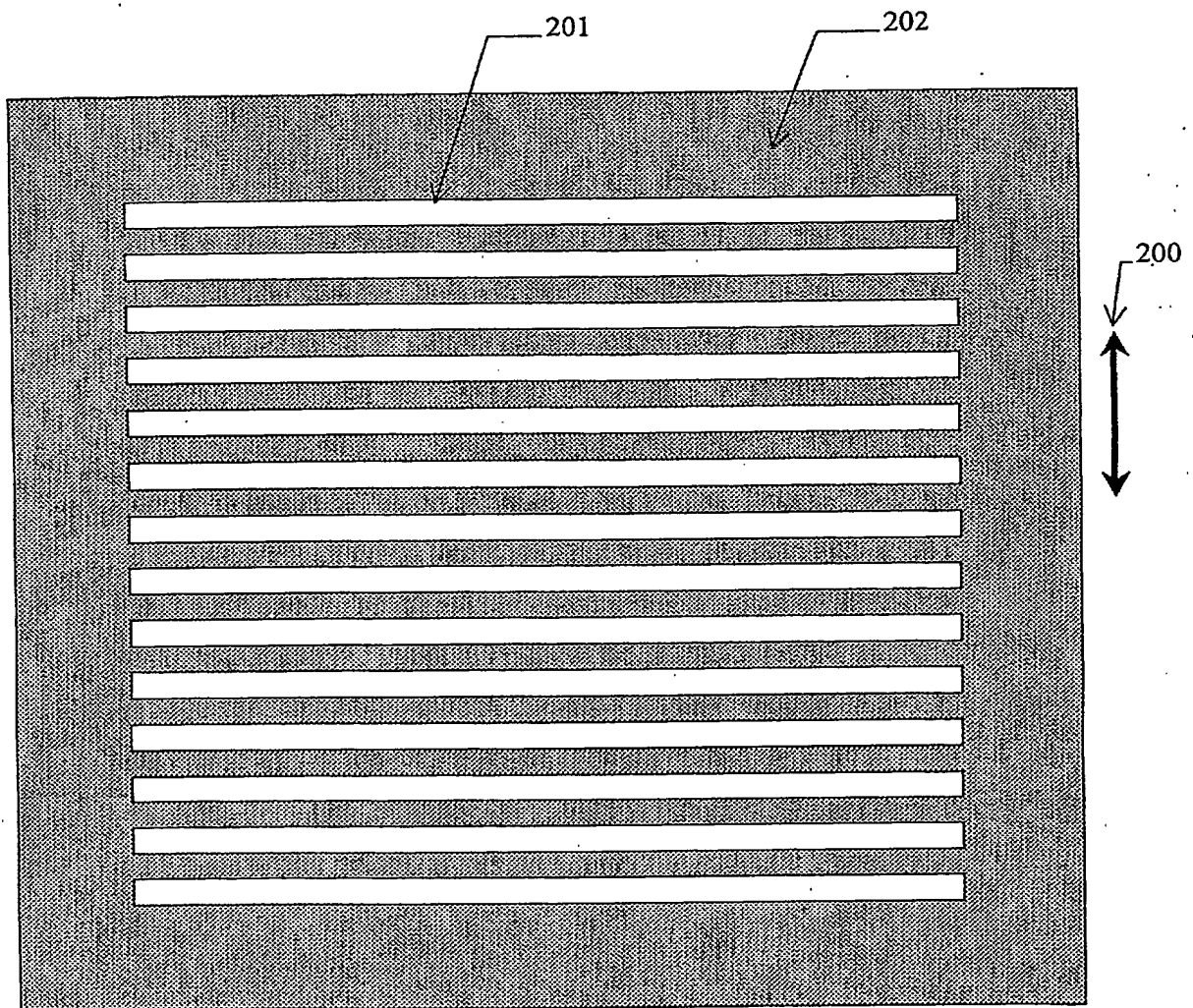
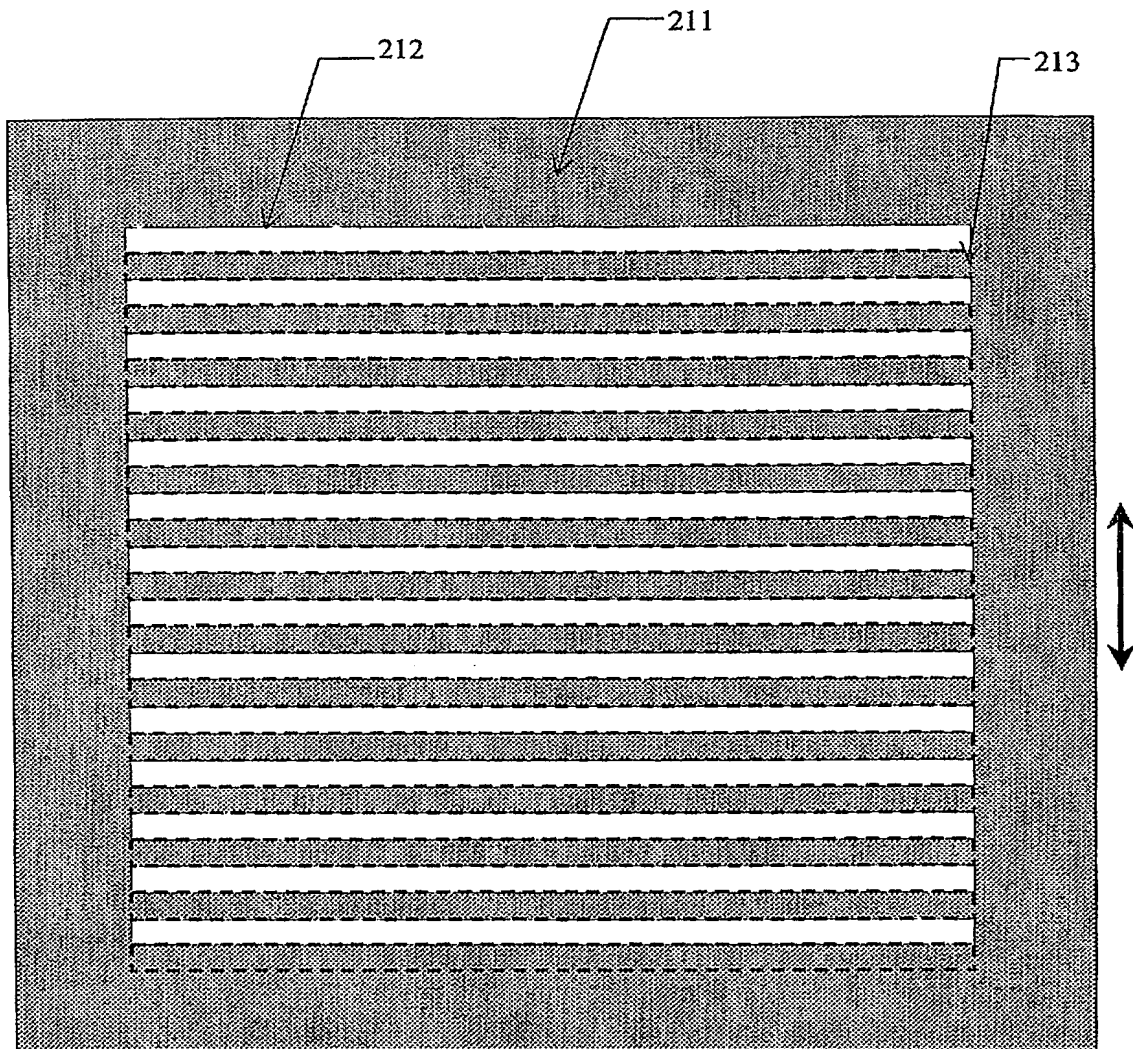


Fig. 1

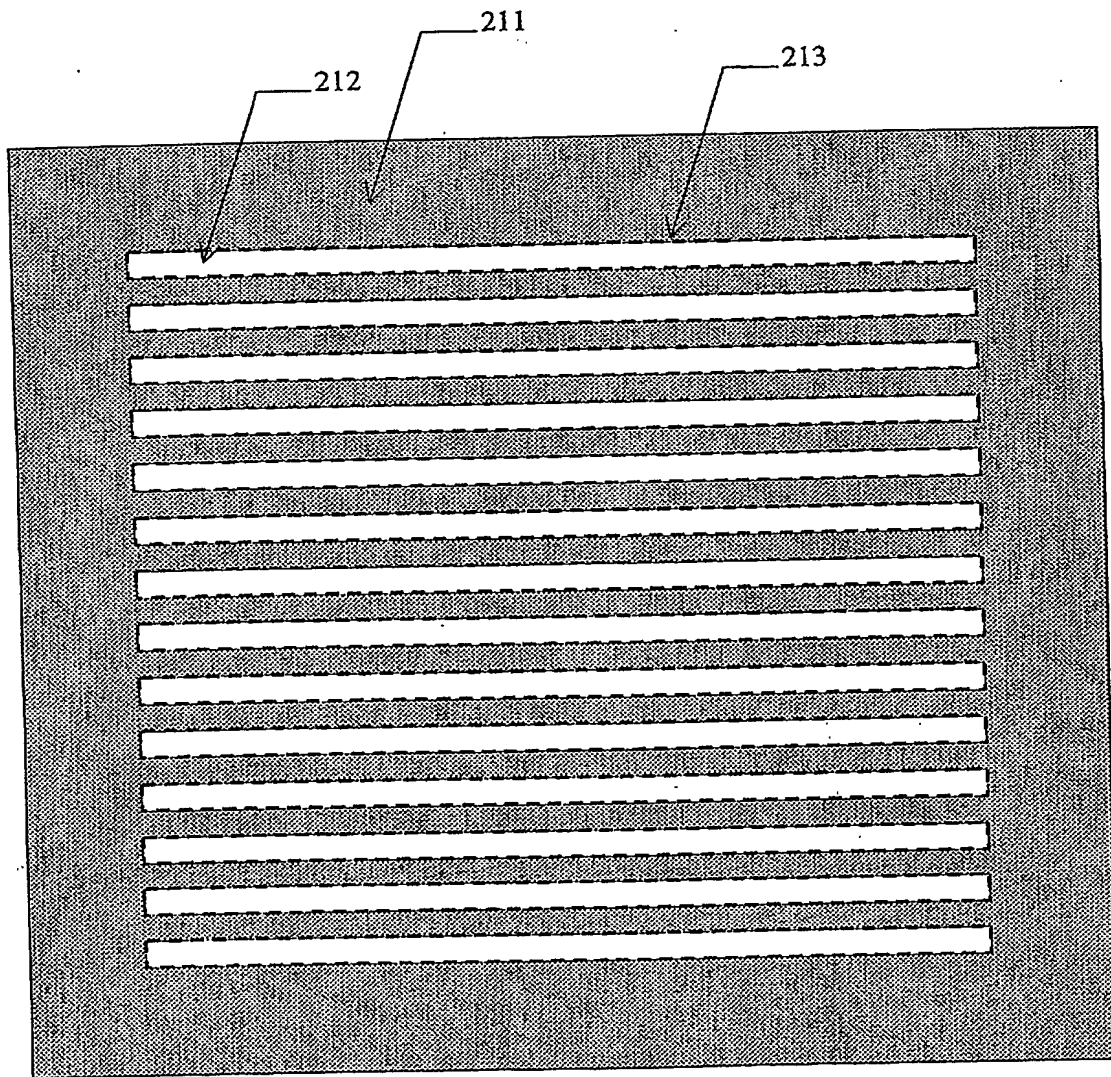


**Fig. 2**



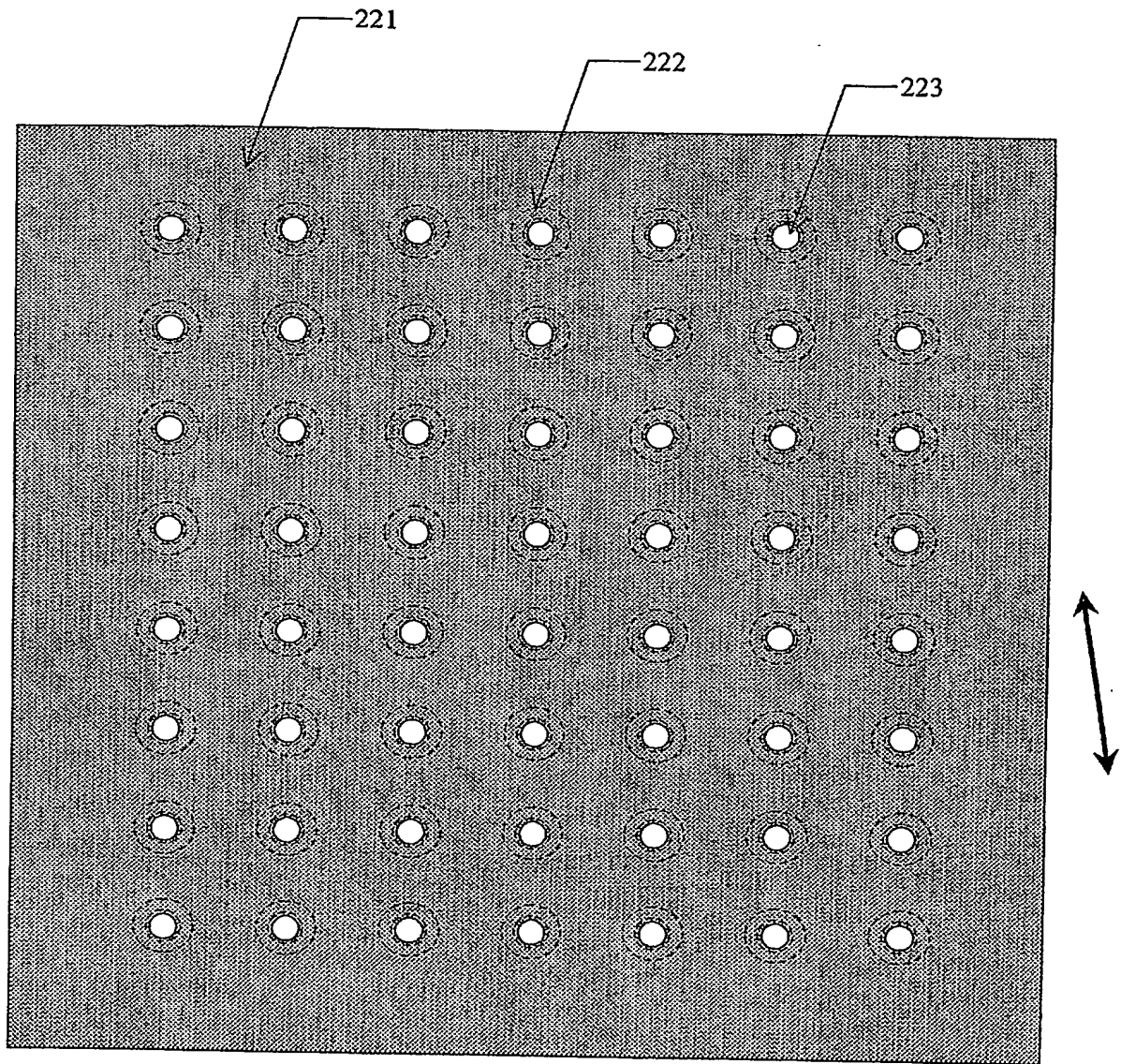
**Fig. 3**

4/24



**Fig. 4**

5/24



**Fig. 5**





6/24

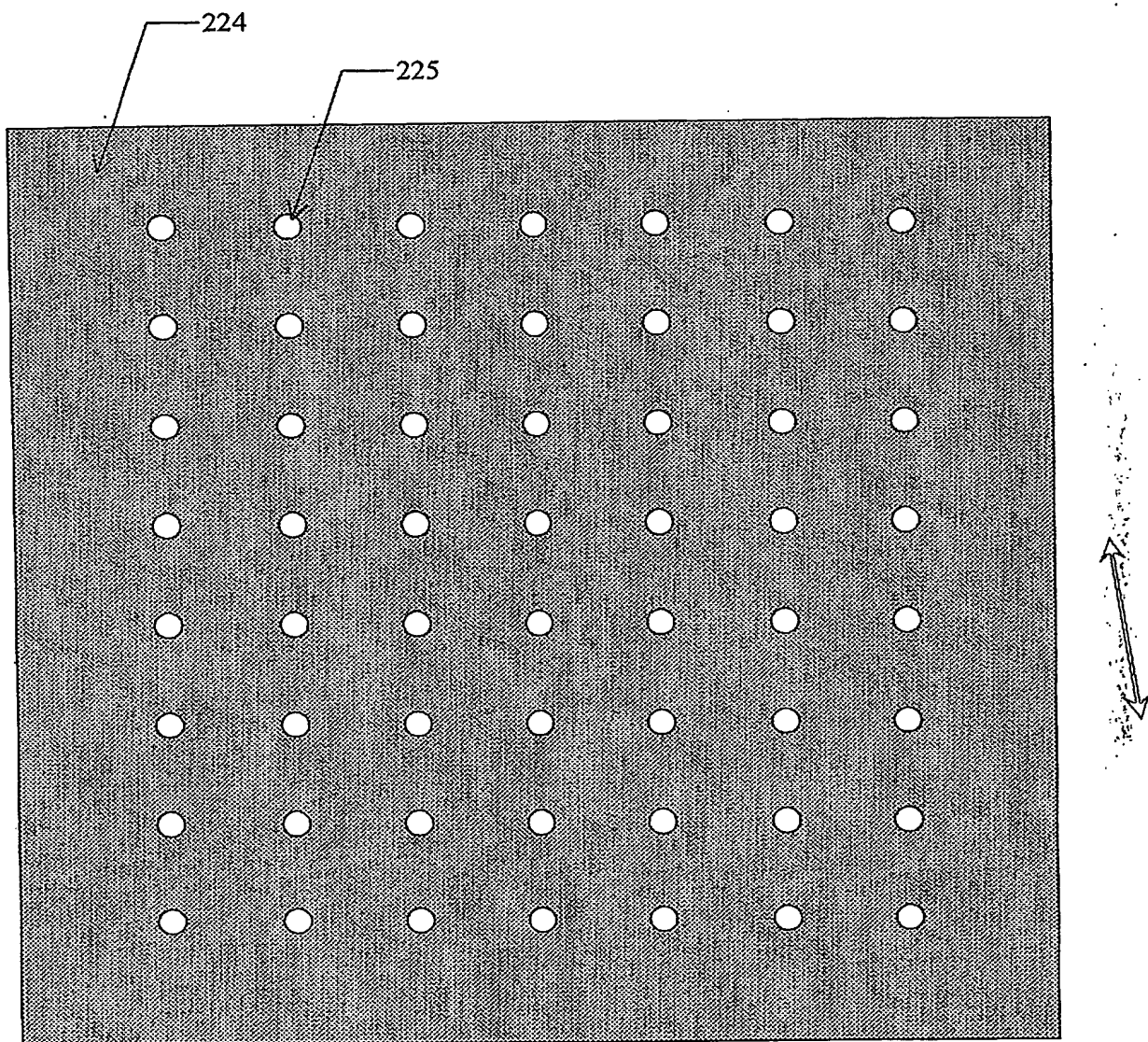
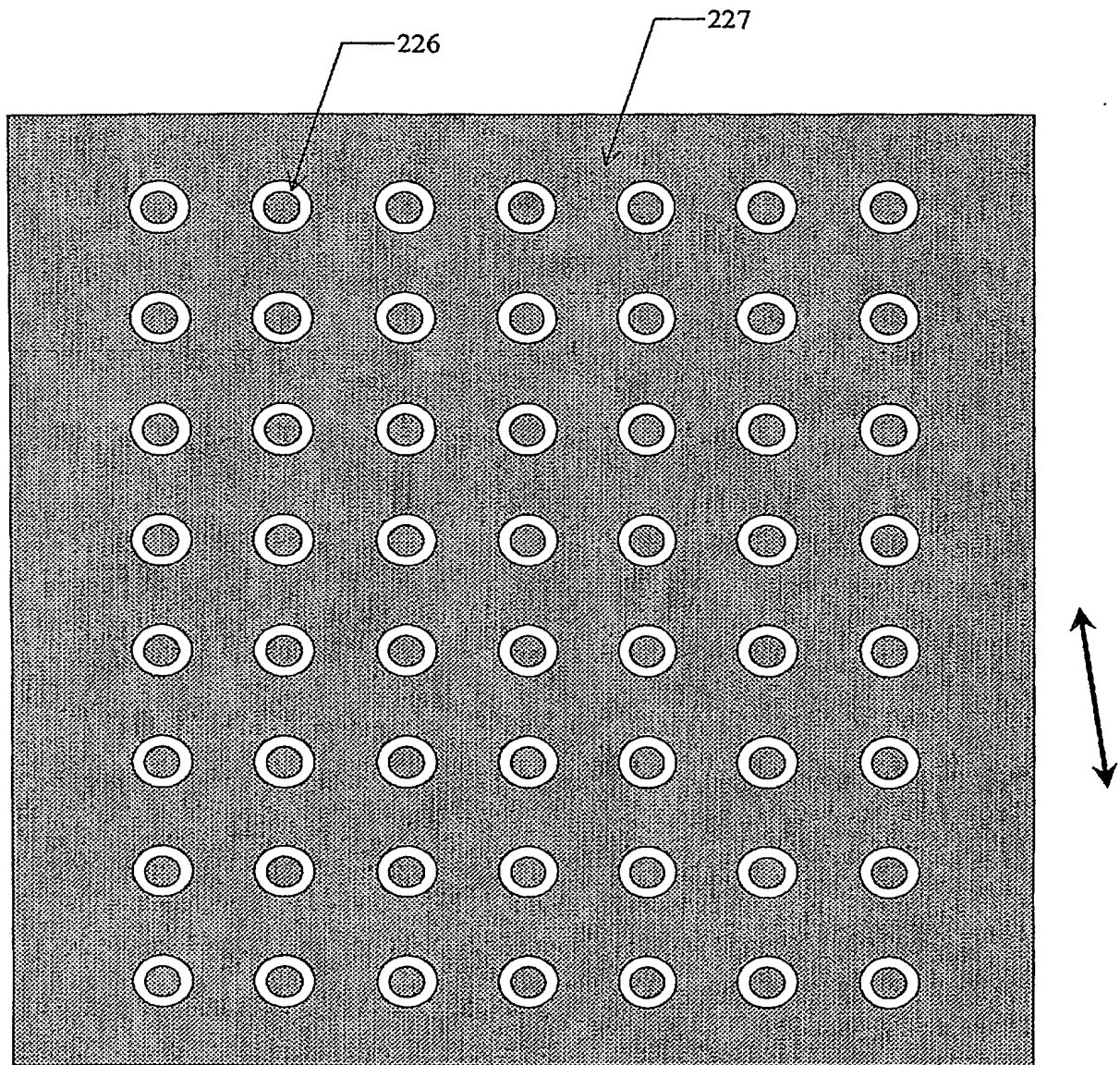


Fig. 6

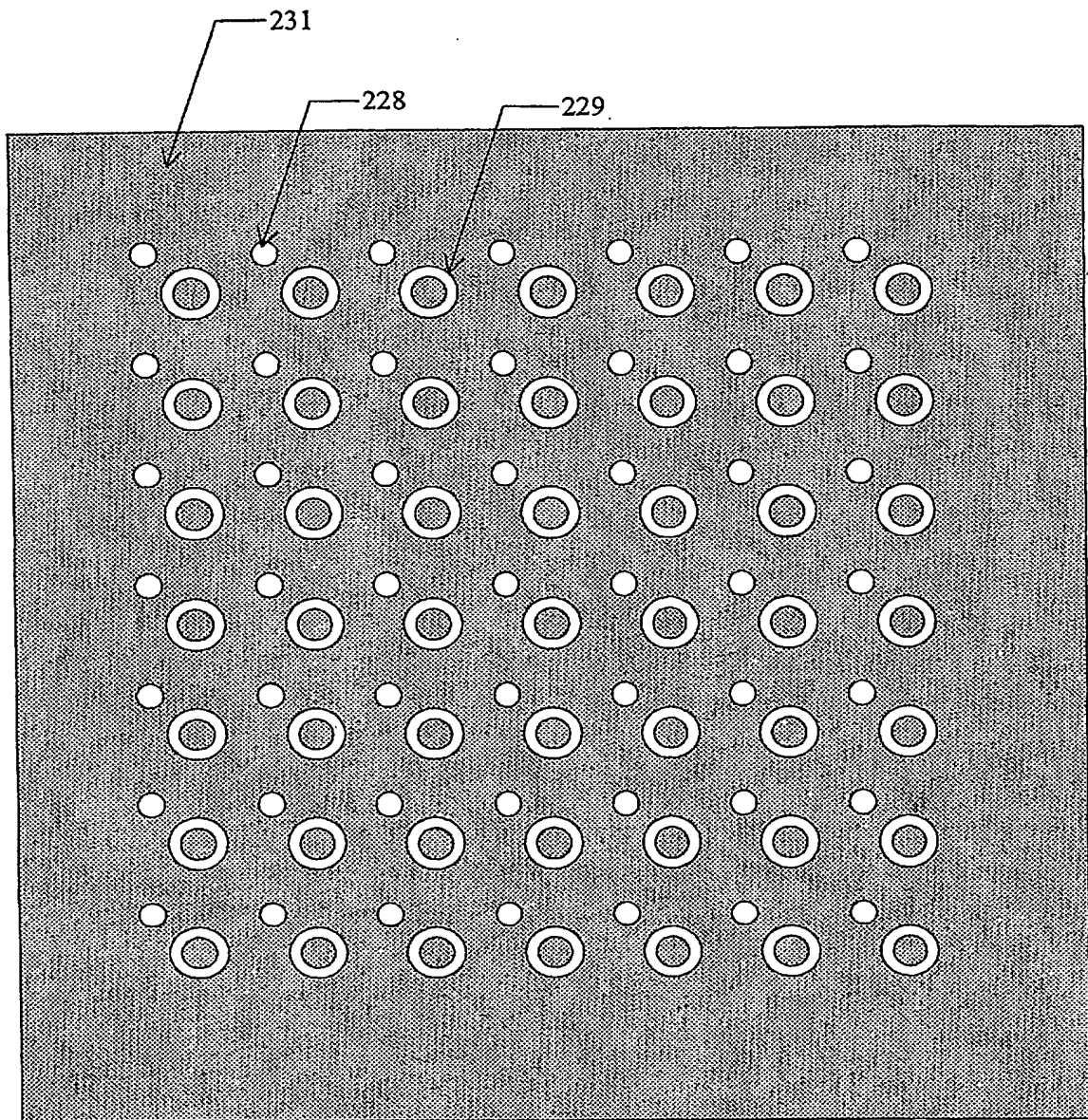


7/24



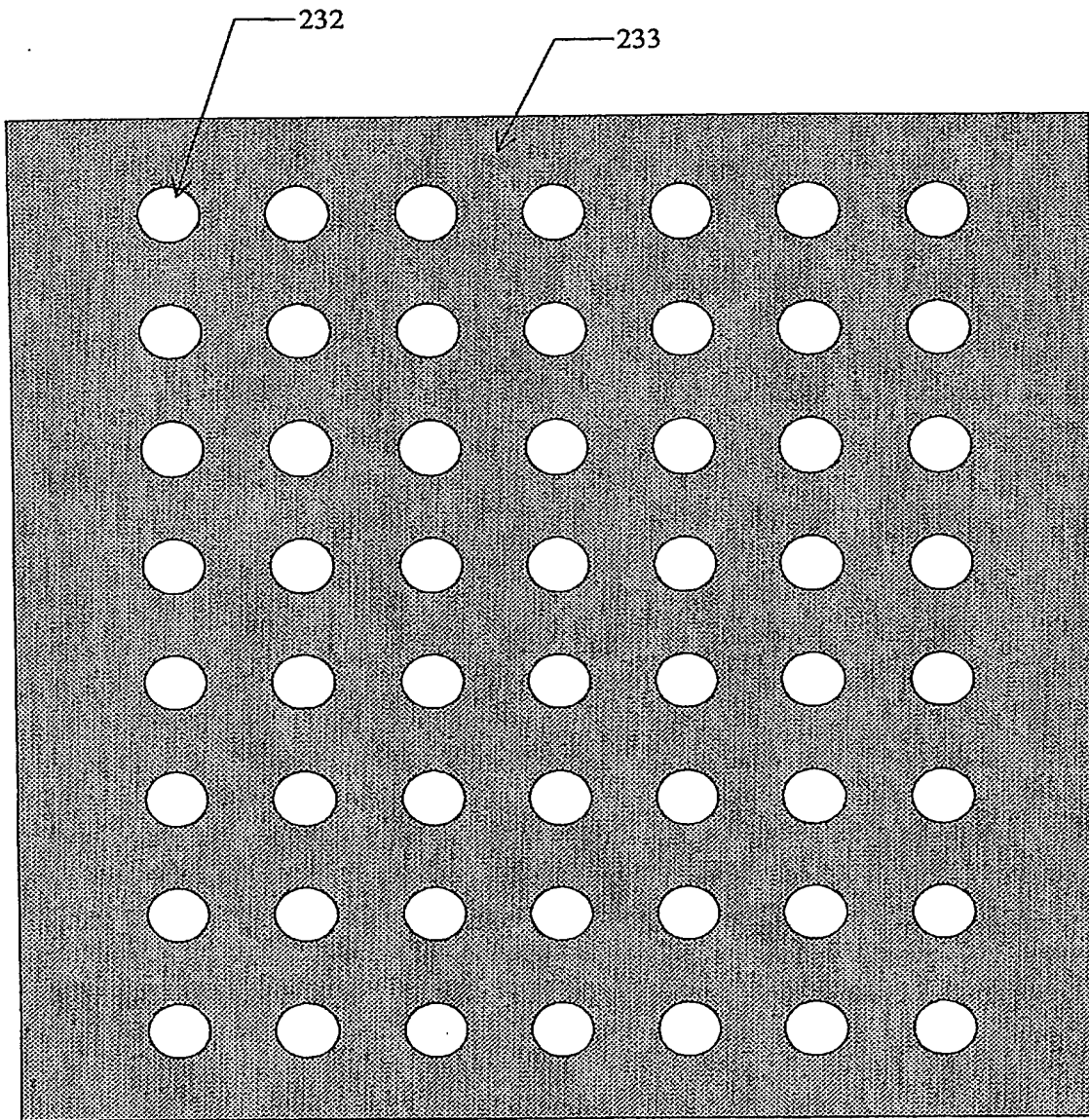
**Fig. 7**

8/24



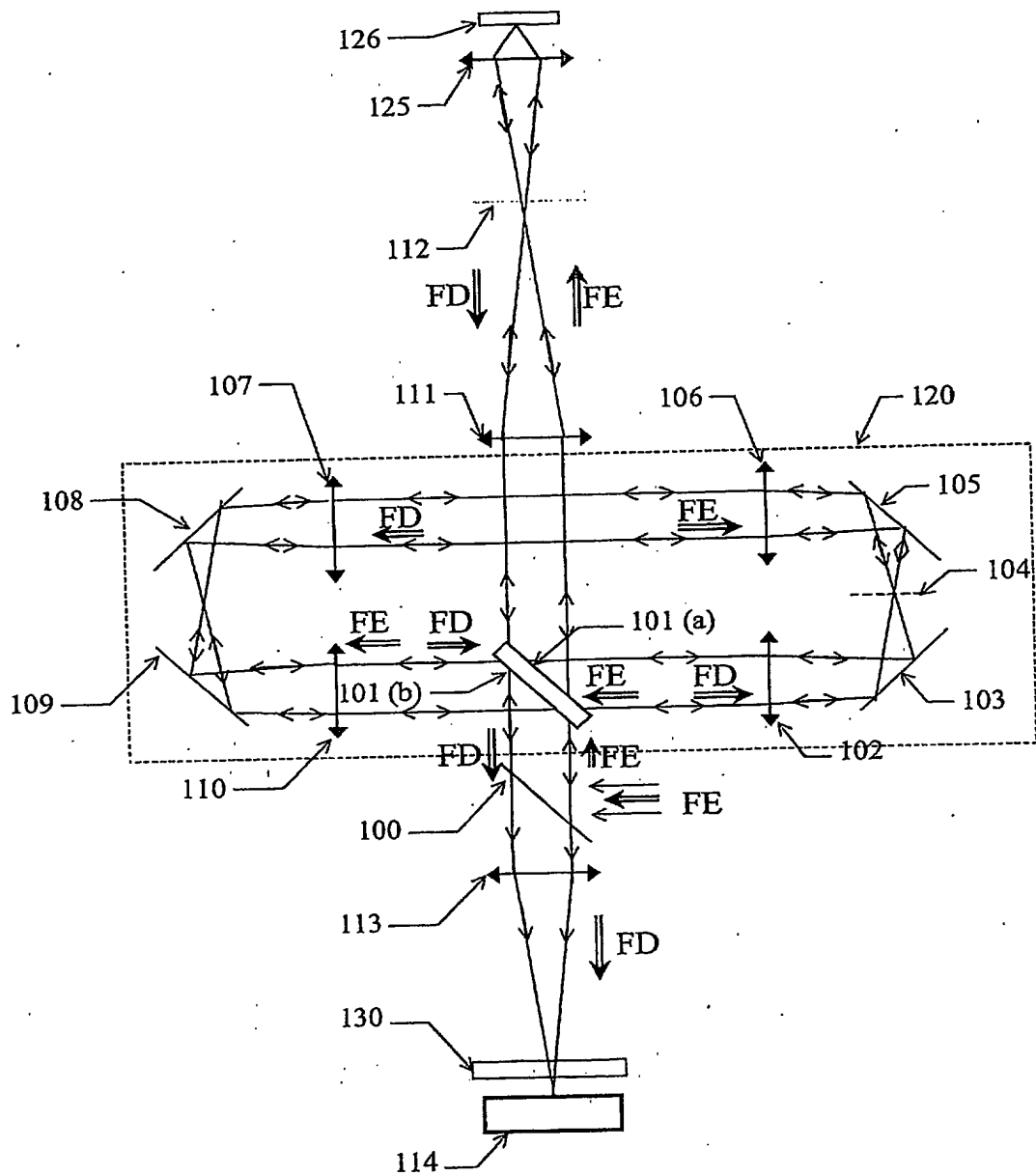
**Fig. 8**

9/24



**Fig. 9**

10/24



**Fig. 10**

11/24

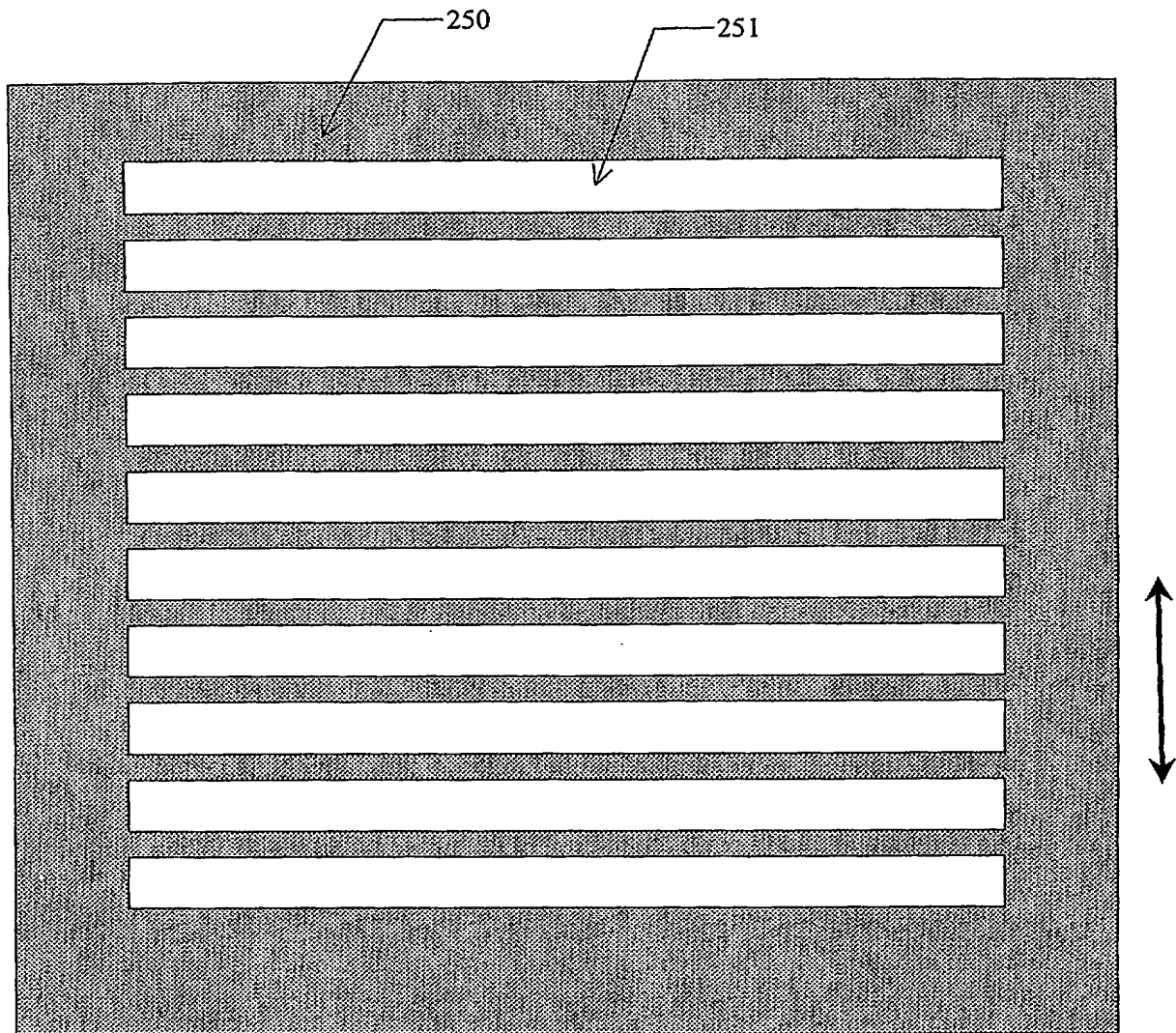


Fig.11

12/24

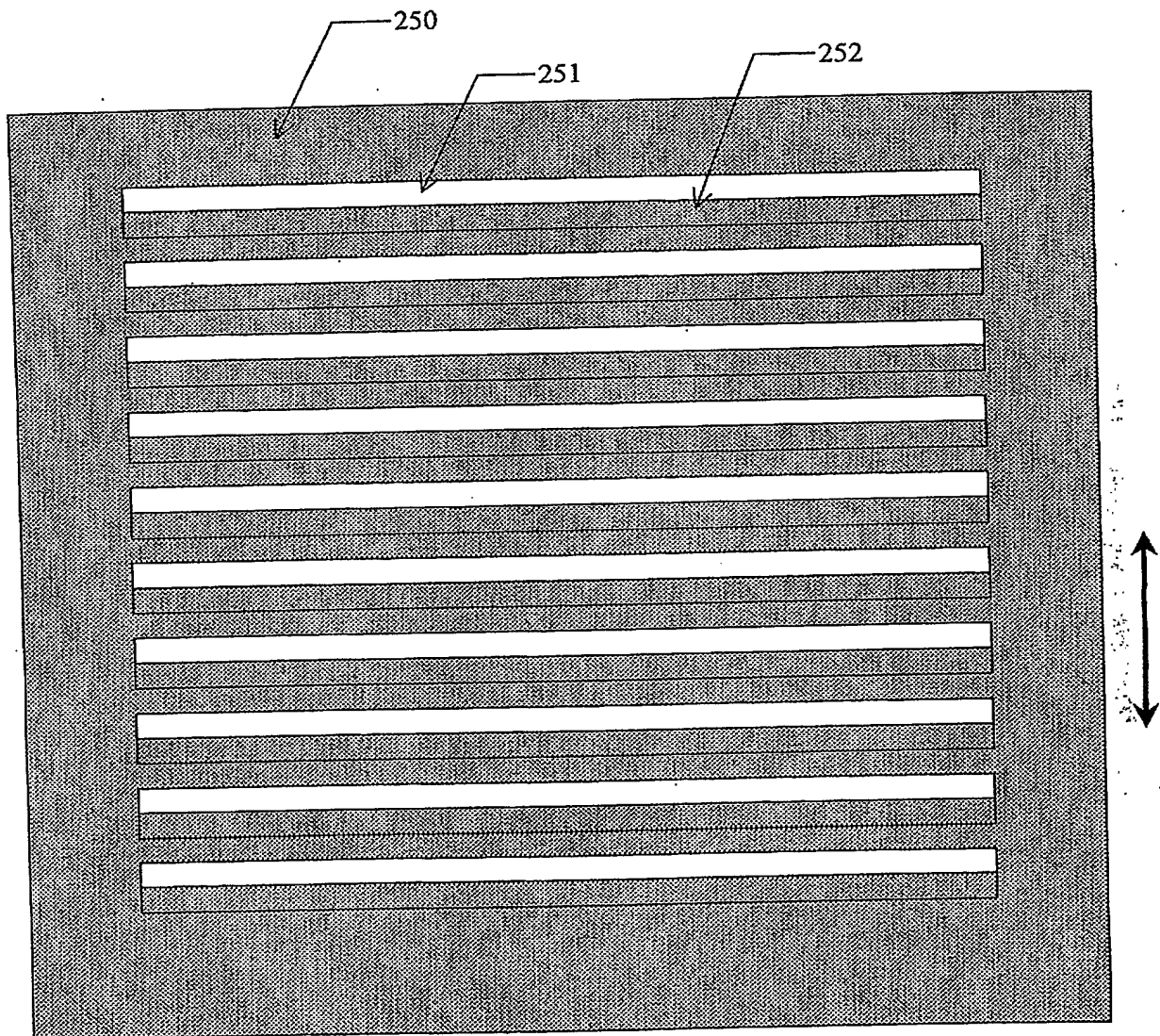


Fig.12



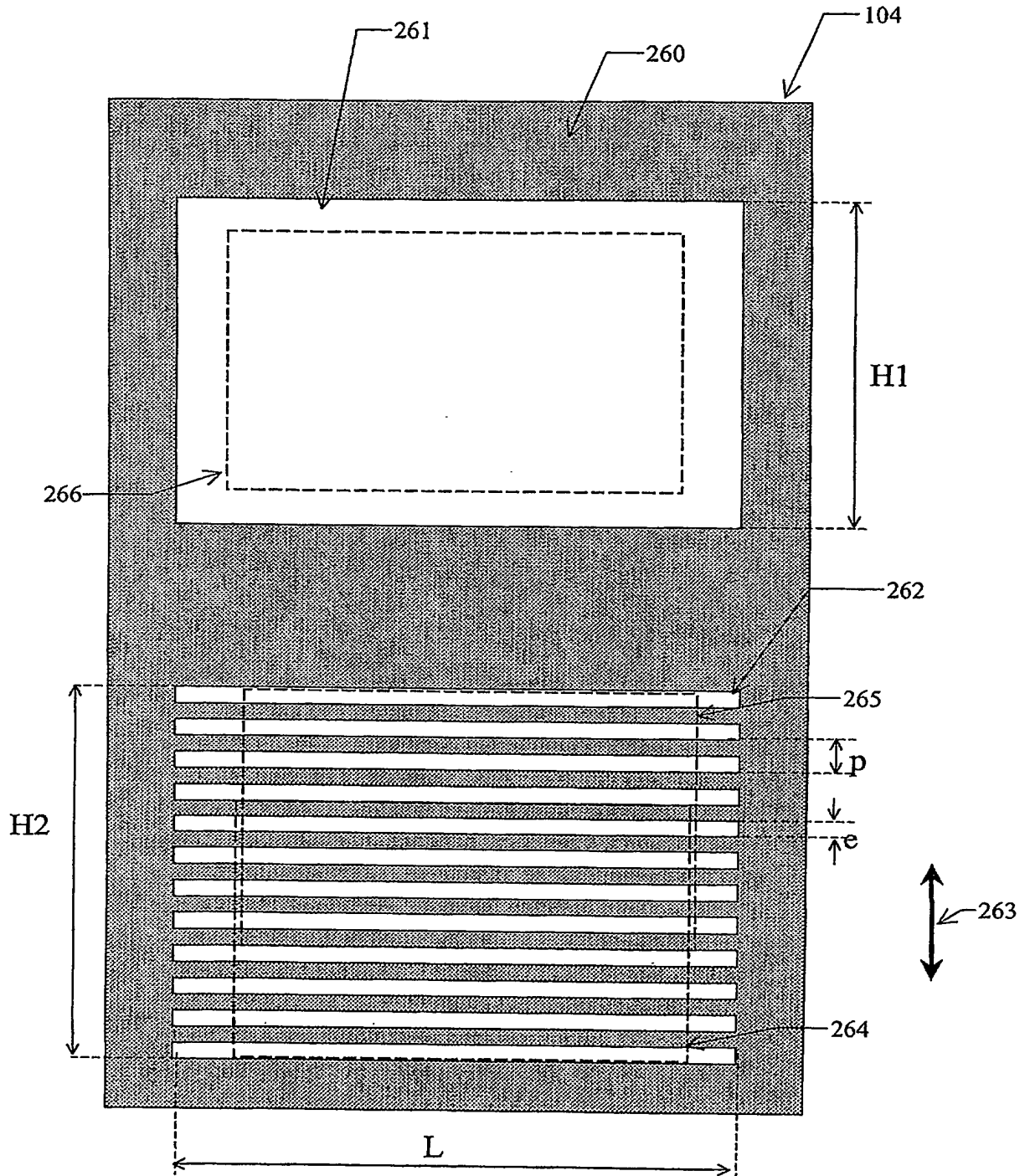


Fig.13

14/24

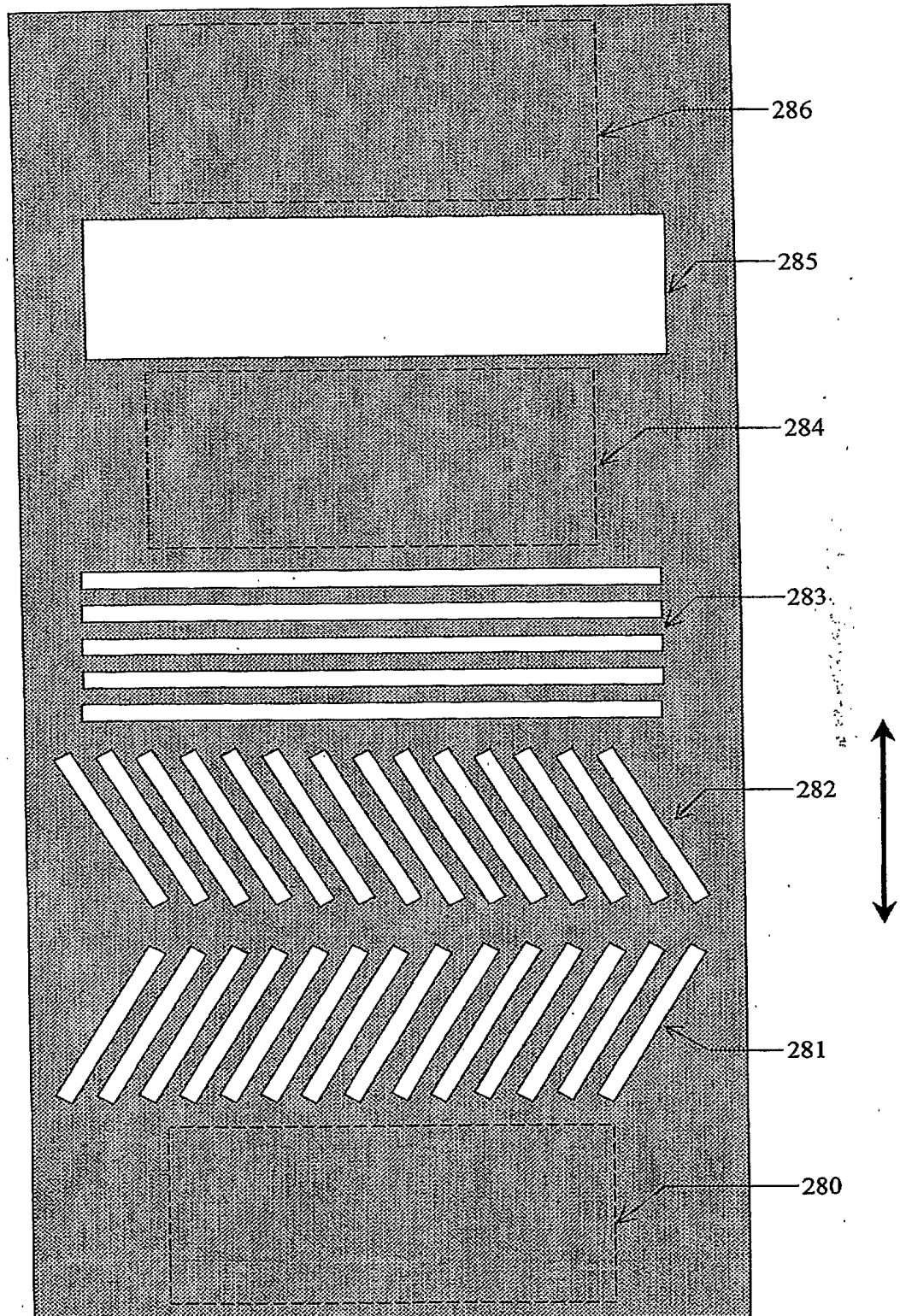
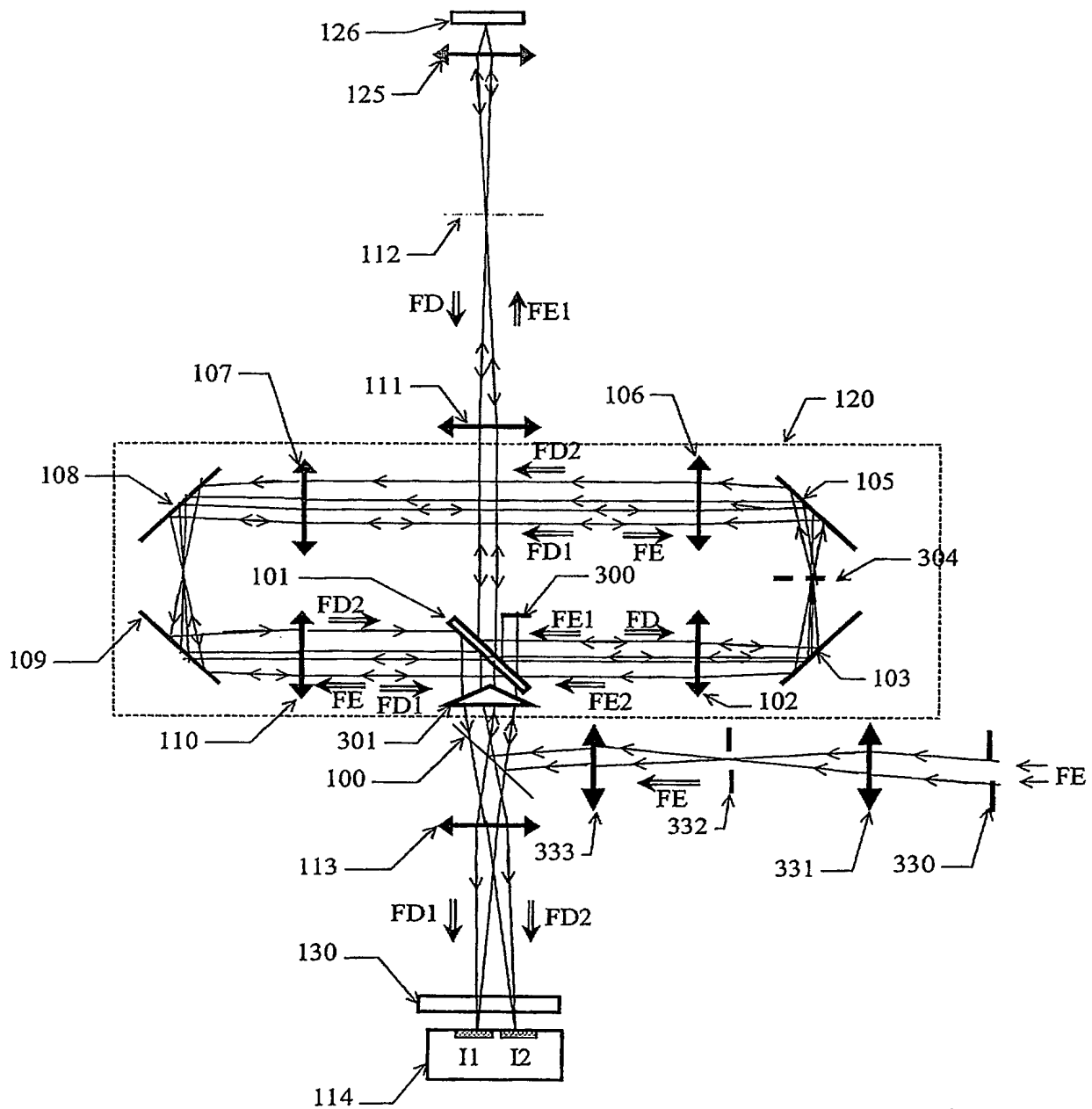


Fig.14





16/24

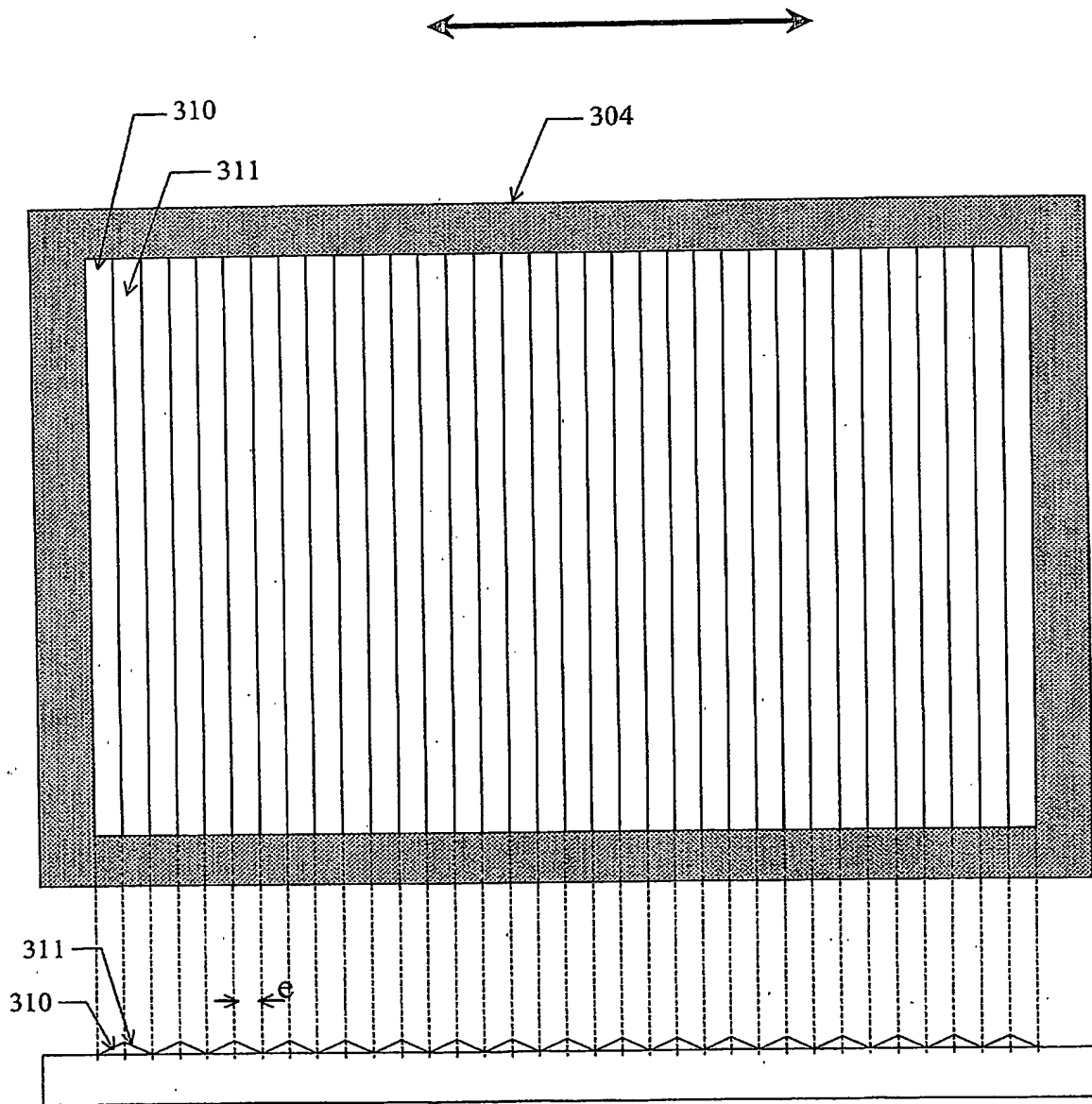
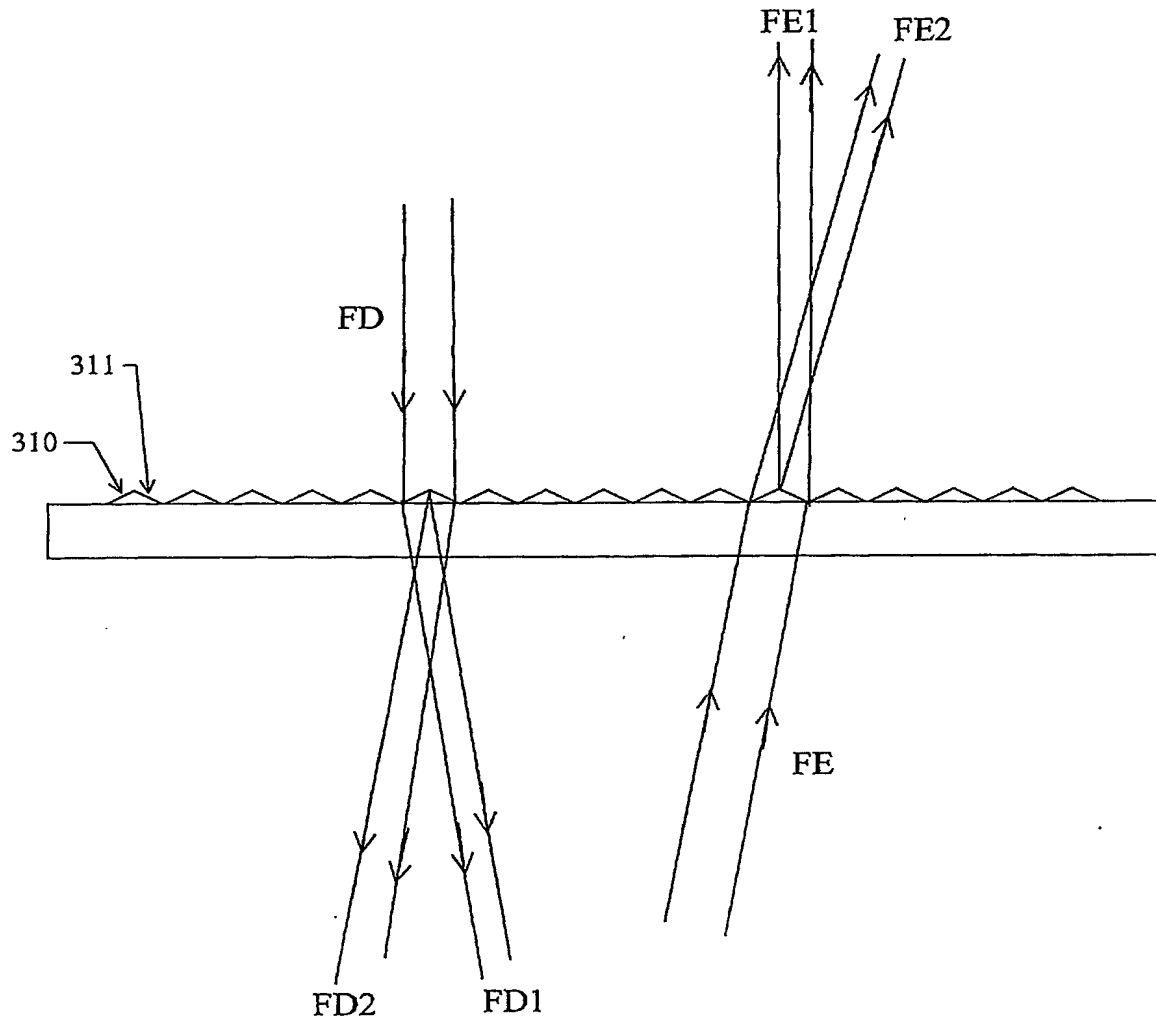
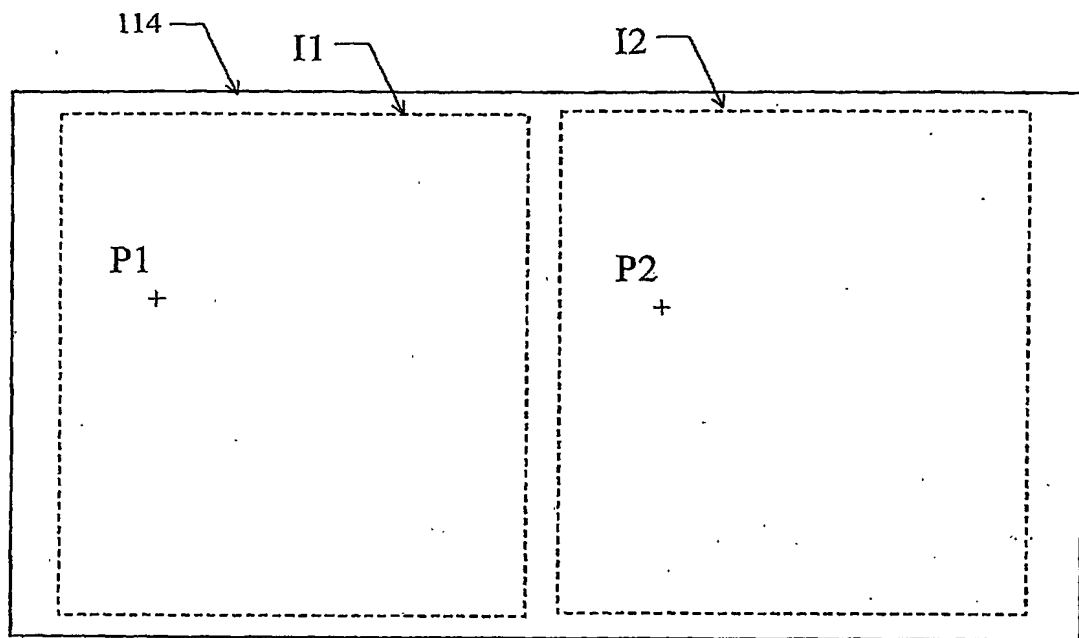


Fig. 16

17/24

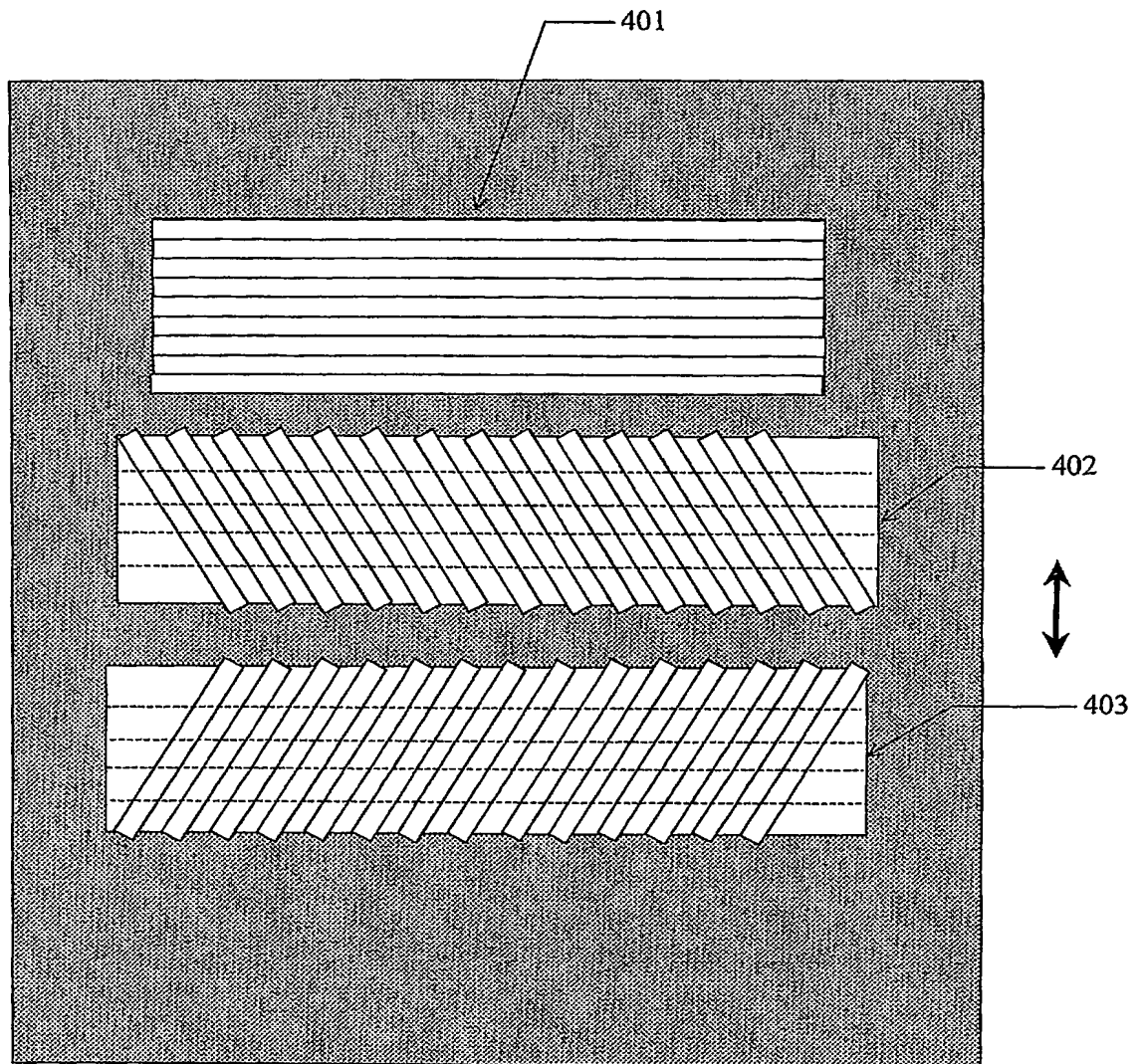


**Fig. 17**



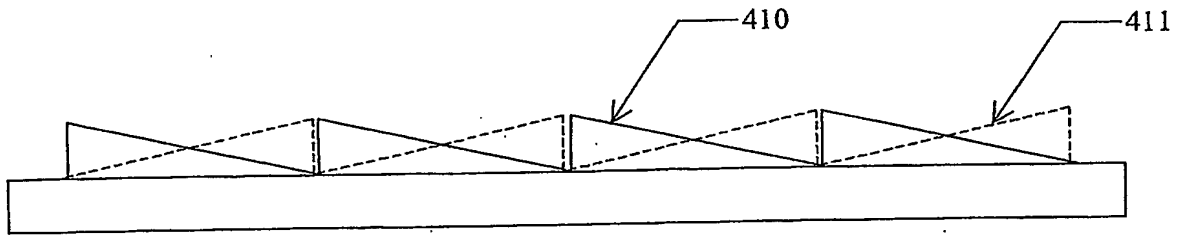
**Fig. 18**

19/24

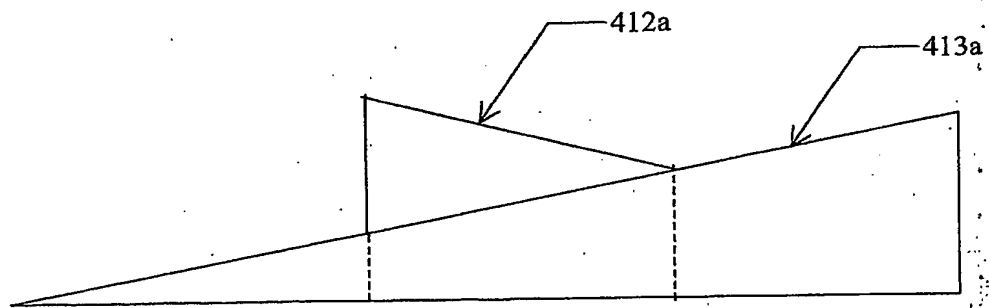


**Fig. 19**

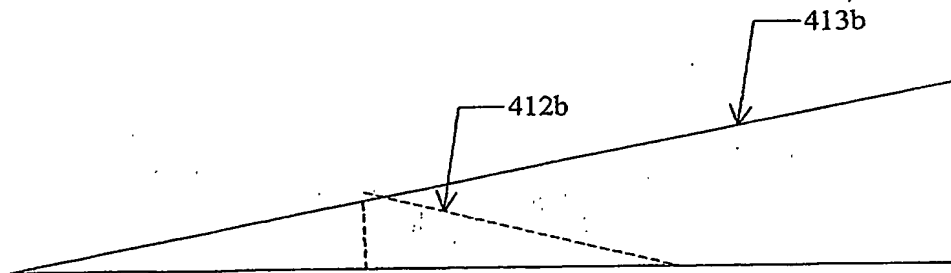
20/24



**Fig. 20**



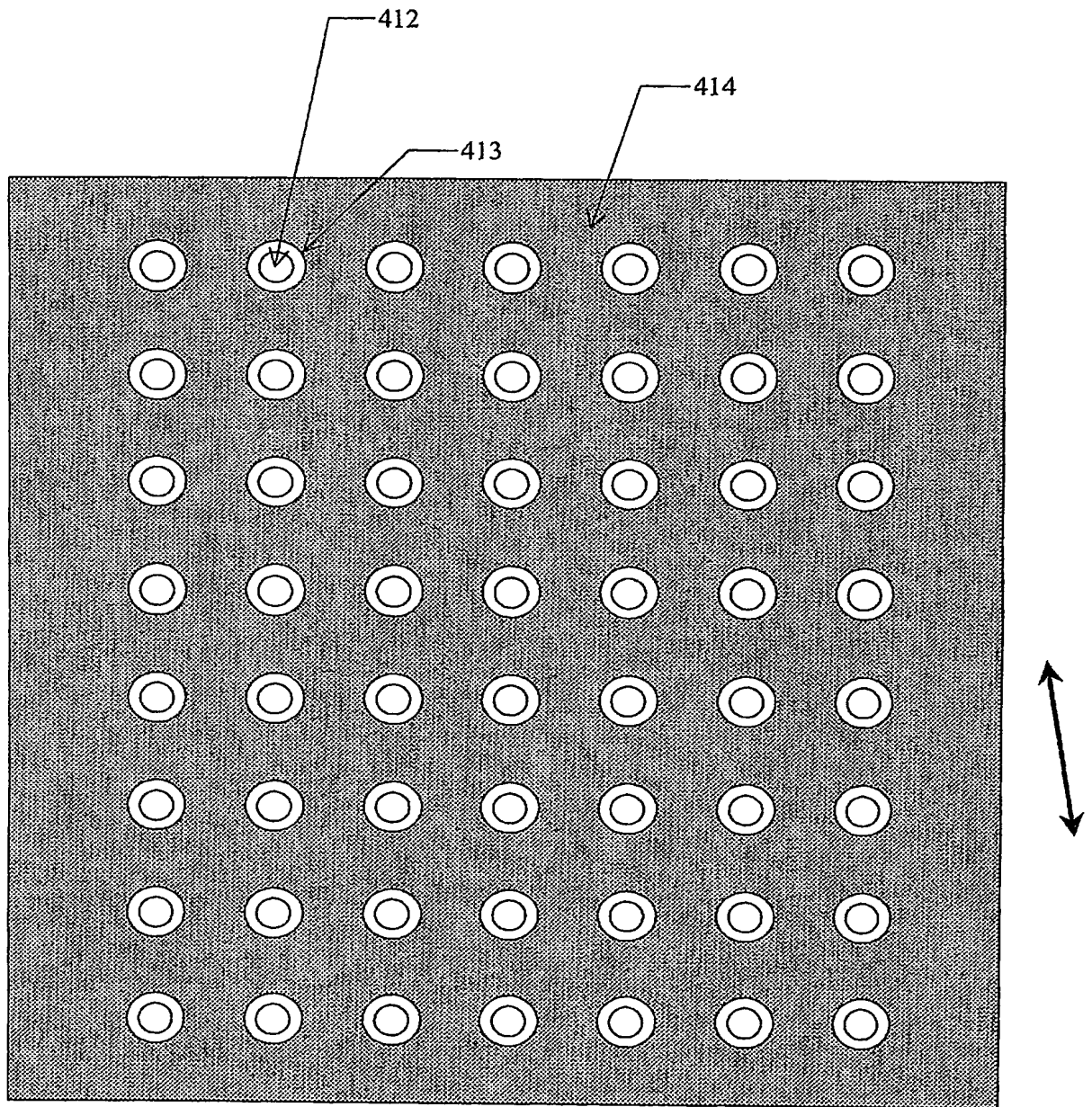
**Fig. 21**



**Fig. 22**

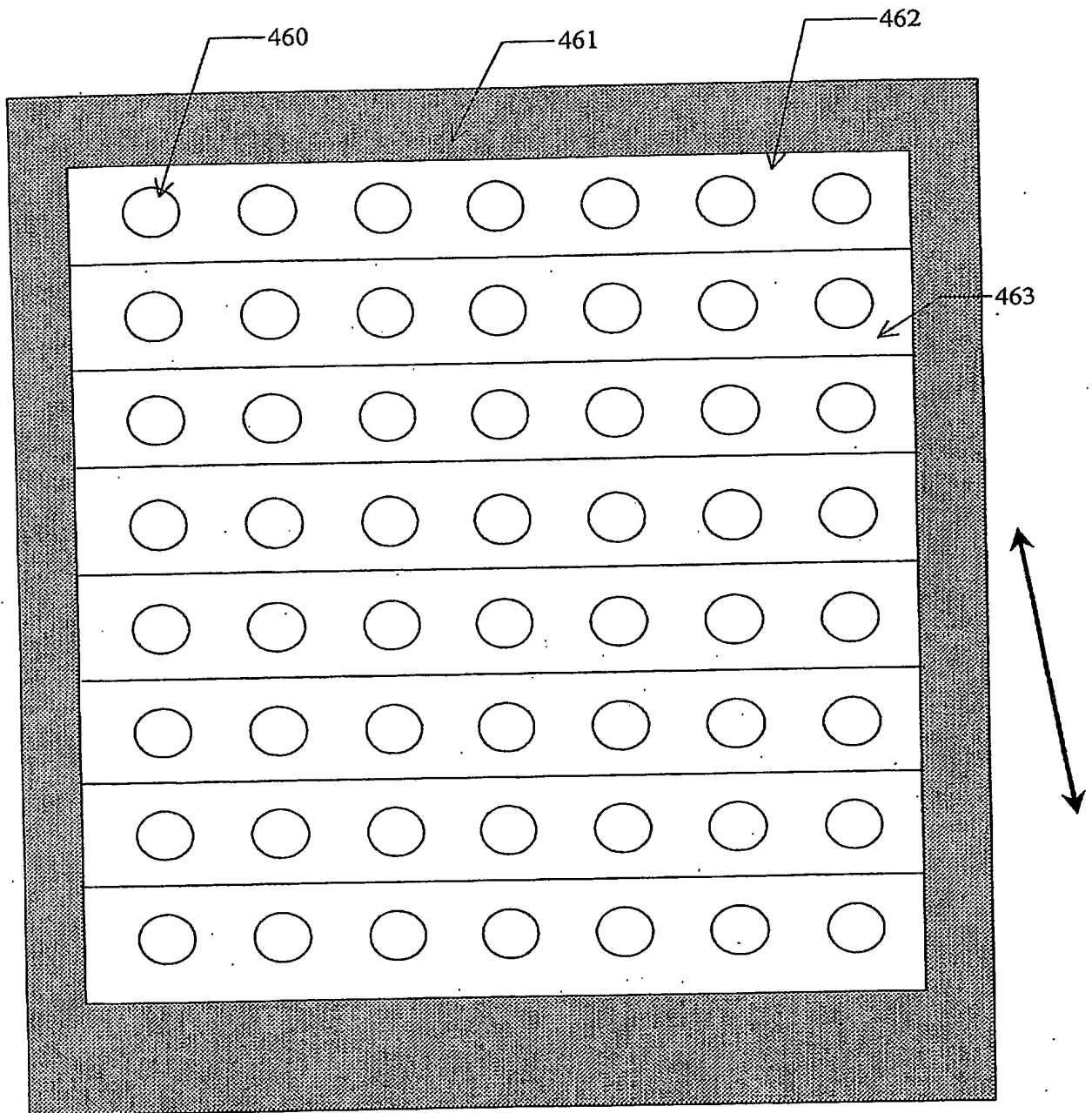


21/24



**Fig. 23**

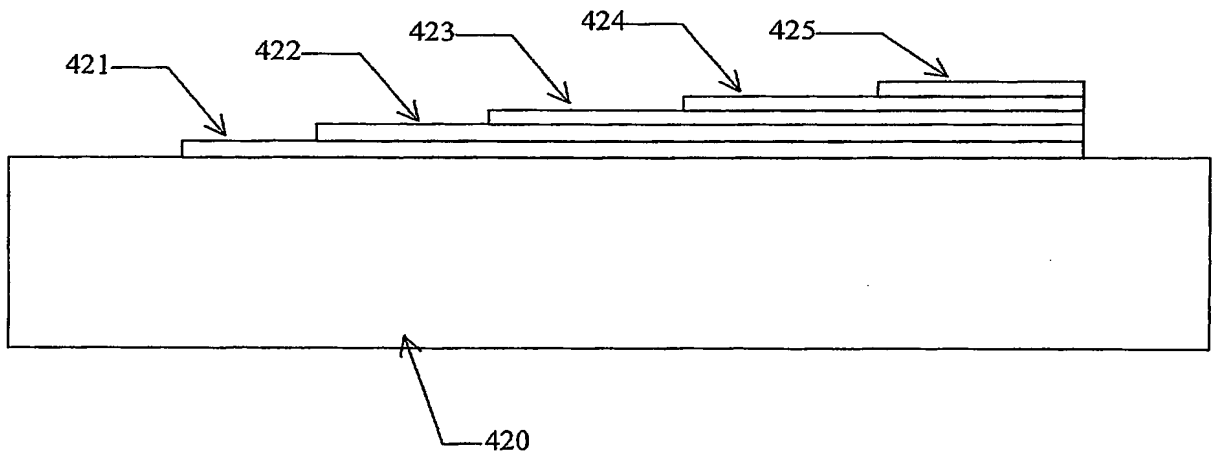
22/24



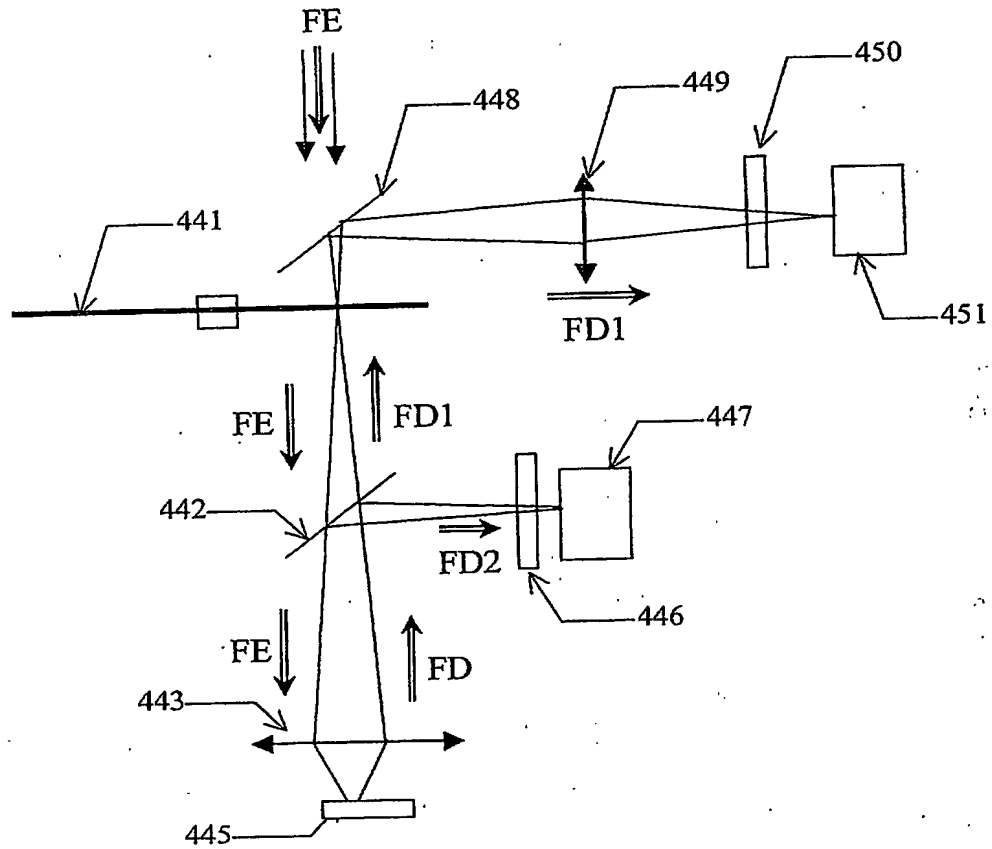
**Fig. 24**



23/24



**Fig. 25**

**Fig. 26**